



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 41 248 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 07 K 7/06
A 61 K 38/08
A 61 P 13/08

⑲ Aktenzeichen: 199 41 248.0
⑳ Anmeldetag: 31. 8. 1999
㉑ Offenlegungstag: 2. 3. 2000

DE 199 41 248 A 1

⑥ Innere Priorität:
198 39 817. 4 01. 09. 1998
⑦ Anmelder:
ASTA MEDICA AG, 01277 Dresden, DE

⑦ Erfinder:
Dechantsreiter, Michael, Dr., 83355 Grabenstätt, DE;
Kessler, Horst, Prof., 65824 Schwalbach, DE; Bernd,
Michael, Dr., 60316 Frankfurt, DE; Kutscher,
Bernhard, Prof., 63477 Maintal, DE; Beckers,
Thomas, Dr., 60596 Frankfurt, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤ Peptide mit N-substituierten Glycingruppen sowie diese enthaltende Arzneimittel zur Behandlung hormonabhängiger Tumore
- ⑤ Die Erfindung betrifft N-substituierte Glycinderivate und Peptide, die eines oder zwei dieser Glycinderivate als Baustein enthalten. Arzneimittel, in denen die erfindungsgemäßen Peptide enthalten sind, können zur Behandlung hormonabhängiger Tumore verwendet werden.

DE 199 41 248 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Peptide mit N-substituierten Glycingruppen, Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen, Arzneimittel, in denen diese Verbindungen enthalten sind, sowie die Verwendung der Arzneimittel zur Behandlung hormonabhängiger Tumore.

Die Dreibuchstabenabkürzungen der Aminosäuren, die in dieser Anmeldung verwendet werden, entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur (Eur. J. Biochem. 1984, 138, 9–37).

Die N-substituierten Glycinderivate werden entsprechend der Funktionalität ihrer Seitenkette mit dem klein geschriebenen Dreibuchstaben-Code des jeweiligen Aminosäureanalogons und dem Buchstaben N als Präfix bezeichnet.

Weitere, in dieser Anmeldung verwendete Abkürzungen sind im folgenden aufgeführt:

- 1D, 2D eindimensional, zweidimensional
- AAV allgemeine Arbeitsvorschrift
- Abb. Abbildung
- 15 abs. absolut
- ACN Acetonitril
- AS Aminosäure
- At 7-Azabenzotriazol-1-yl
- Boc tert.-Butyloxycarbonyl
- 20 bs breites Singulett
- BTSA Bistrimethylsilylacetamid
- Bzl Benzyl
- °C Grad Celsius
- cTrt 2-Chlorotriethylchlorid
- 25 d Dublett
- δ chemische Verschiebung
- dd Doppeldublett
- DC Dünnschichtchromatographie
- DCM Dichlormethan
- 30 DEAD Diethylazodicarboxylat
- DIBAH Diisobutylaluminiumhydrid
- DIPEA Diisopropylethylamin
- DMAP 4-(Dimethylamino)pyridin
- DMF Dimethylformamid
- 35 DMSO Dimethylsulfoxid
- EDCI N-Ethyl-N,N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
- eq Äquivalent
- Et Ethyl
- Fmoc 9-Fluorenylmethoxycarbonyl
- 40 g Gramm
- h Stunde
- HATU O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
- HOAc Essigsäure
- HOAt 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
- 45 HOBt 1-Hydroxybenzotriazol
- HOObt 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin
- HPLC Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
- IC₅₀ inhibitory capacity
- iPr iso-Propyl
- 50 l Liter
- LHRH Das luteinisierende Hormon freisetzendes Hormon
- LM Lösungsmittel
- M Molar
- m Multiplett
- 55 Mc Methyl
- MeOH Methanol
- ml Milliliter
- mmol Millimol
- MS Massenspektrometrie
- 60 Mtr 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl
- μM Mikromolar
- N Normal
- Nbs Nitrobenzolsulfonyl
- nM Nanomolar
- 65 NMP N-Methylpyrrolidon
- NMR nuclear magnetic resonance
- Nps Nitrobenzolsulfid
- NSG N-substituiertes Oligoglycin

OAc Acetat	
Pbf 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl	
PNA Peptidnukleinsäure	
ppb parts per billion	
ppm parts per million	5
Prop Propyl-	
q Quartett	
R _f Retentionsfaktor	
RT Raumtemperatur	
s Singulett	10
t Triplett	
tBu tert.-Butyl-	
TBDMS tert.-Butyldimethylsilyl	
TBTU O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat	
TCP Tritylchlorid-Polystyrol	15
TEA Triethylamin	
TFA Trifluoressigsäure	
THF Tetrahydrofuran	
Trt Trityl	
TPP Triphenylphosphin	20
UV Ultraviolett	
Xxx beliebige Aminosäure	
Z Benzyloxycarbonyl-	

Die erfindungsgemäßen Peptide stellen Analoge des das luteinisierende Hormon freisetzenden Hormons (LH-RH) dar, das die folgende Struktur aufweist: 25

p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, [LH-RH, Gonadorelin].

Während mehr als 20 Jahren haben Forscher nach selektiv potenten Antagonisten des LH-RH-Dekapeptids [M. Karten und J. E. Rivier, Endocrine Reviews 7, 44-66 (1986)] gesucht. Das hohe Interesse an solchen Antagonisten ist in ihrer Nützlichkeit im Bereich der Endokrinologie, Gynäkologie, Schwangerschaftsverhütung und Krebs begründet. Eine große Anzahl von Verbindungen sind als potentielle LH-RH-Antagonisten hergestellt worden. Die interessantesten Verbindungen, die bis heute gefunden wurden, sind jene Verbindungen, deren Struktur eine Modifizierung der LH-RH-Struktur darstellen. 30 35

Die erste Serie von potenten Antagonisten wurde durch die Einführung von aromatischen Aminosäureresten in den Positionen 1, 2, 3 und 6 oder 2, 3 und 6 erhalten. Die übliche Schreibweise der Verbindungen sieht wie folgt aus: Es werden zunächst die Aminosäuren angegeben, die in der Peptidkette von LH-RH an die Stelle der ursprünglich vorhandenen Aminosäuren getreten sind, wobei die Positionen, an denen der Austausch stattfand, durch hochgestellte Ziffern gekennzeichnet werden. Weiterhin wird durch die nachgestellte Bezeichnung "LH-RH" zum Ausdruck gebracht, daß es sich um LH-RH-Analoge handelt, an denen der Austausch stattfand. 40

Bekannte Antagonisten sind:

[Ac-D-Phe(4-Cl)^{1,2}, D-Trp^{3,6}] LH-RH (D.H. Coy et al., In: Gross, E. and Meienhofer, J. (Eds) Peptides; Proceedings of the 6th American Peptide Symposium, S. 775-779, Pierce Chem.Co., Rockville III. (1979); [Ac-Pro¹, D-Phe(4-Cl)², D-Nal(2)^{3,6}] LH-RH (US-Patent Nr. 4.419.347) und [Ac-Pro¹, D-Phe(4-Cl)², D-Trp^{3,6}] LH-RH (J. L. Pineda, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 56, 420, 1983). 45

Um die Wasserlöslichkeit von Antagonisten zu erhöhen, wurden später basische Aminosäuren, zum Beispiel D-Arg, in der 6-Stellung eingeführt. Zum Beispiel

[Ac-D-Phe(4-Cl)^{1,2}, D-Trp³, D-Arg⁶, D-Ala¹⁰] LH-RH (ORG-30276) (D. H. Coy, et al., Endocrinology 100, 1445, 1982); und 50

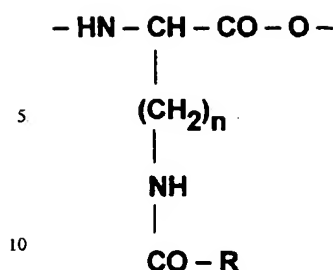
[Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4-F)², D-Trp³, D-Arg⁶] LH-RH (ORF 18260) (J. E. Rivier et al., in: Vickery B. H. Nestor, Jr. J. J., Hafez, E. S. E (Eds). LHRH and its Analogs, S. 11-22 MTP Press, Lancaster, UK 1984).

Weitere potente LH-RH-Antagonisten sind in WO 92/19651, WO 94/19370, WO 92/17025, WO 94/14841, WO 94/13313, US-A 5,300,492, US-A 5,140,009, EP 0 413 209 A1 und DE 195 44 212 A1 beschrieben.

Letztere offenbart Verbindungen mit einem modifizierten Ornithin- oder Lysin-Baustein in Position 6, welche der folgenden Formel entsprechen: 55

Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Xxx⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,

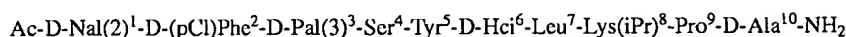
worin D-Xxx eine Aminosäuregruppe der allgemeinen Formel (VI) 60



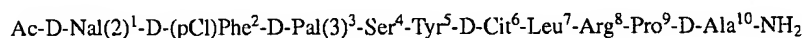
darstellt.

Weitere bekannte LH-RH-Antagonisten sind Antarelix bzw. Cetrorelix.

Antarelix:

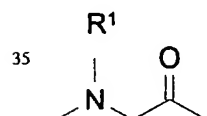


Cetrorelix:



Ziel der Erfindung ist, neue LH-RH-Antagonisten zu schaffen, die eine erhöhte enzymatische Stabilität und Wasserlöslichkeit aufweisen.

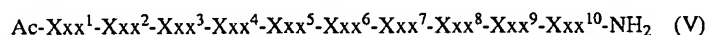
Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß einzelne Bausteine in der Aminosäurekette der oben genannten LH-RH-Antagonisten durch N-iso-Butyl-glycin-(Nleu), N-2-(4'-Hydroxy-phenyl)-ethyl-glycin-(Nhtyr), N-2-Hydroxy-ethyl-glycin-(Nhser), N-(N'-iso-Propyl-4-amino-butyl)-glycin-(Nlys(iPr)), N-3-Guanidino-propyl-glycin-(Narg), N-3-Ureido-propyl-glycin-(Ncit), N-4-Ureido-propyl-glycin-(NHcit), N-Pyrid-2-yl-methyl-glycin-(Npal(2)), N-Pyrid-3-yl-methyl-glycin-(Npal(3)), N-Pyrid-4-yl-methyl-glycin-(Npal(4)), N-Naphth-1-yl-methyl-glycin-(Nnal(1)), N-Naphth-2-yl-methyl-glycin-(Nnal(2)) oder N-(4'-Chlor-phenyl)-methyl-glycin-gruppe (N(pCl)phe) oder eine N-substituierte Glycin-Gruppe mit der allgemeinen Formel I



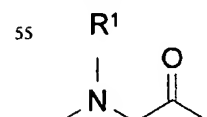
(I)

ersetzt werden.

Bevorzugte LH-RH-Antagonisten, an denen dieser Austausch stattfindet, sind Cetrorelix, Antarelix und die Verbindungen aus der DE 195 44 212. Auf diese Weise entstehen Verbindungen der allgemeinen Formel V

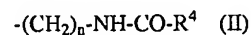


worin einer oder zwei der Bausteine Xxx¹, Xxx², Xxx³, Xxx⁴, Xxx⁵, Xxx⁶, Xxx⁷, Xxx⁸, Xxx⁹ und Xxx¹⁰ eine N-iso-Butyl-glycin-(Nleu), N-2-(4'-Hydroxy-phenyl)-ethyl-glycin-(Nhtyr), N-2-Hydroxy-ethyl-glycin-(Nhser), N-(N'-iso-Propyl-4-amino-butyl)-glycin-(Nlys(iPr)), N-3-Guanidino-propyl-glycin-(Narg), N-3-Ureido-propyl-glycin-(Ncit), N-4-Ureido-propyl-glycin-(NHcit), N-Pyrid-2-yl-methyl-glycin-(Npal(2)), N-Pyrid-3-yl-methyl-glycin-(Npal(3)), N-Pyrid-4-yl-methyl-glycin-(Npal(4)), N-Naphth-1-yl-methyl-glycin-(Nnal(1)), N-Naphth-2-yl-methyl-glycin-(Nnal(2)) oder N-(4'-Chlor-phenyl)-methyl-glycin-gruppe (N(pCl)phe) oder eine N-substituierte Glycin-Gruppe mit der allgemeinen Formel I

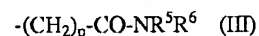


(I)

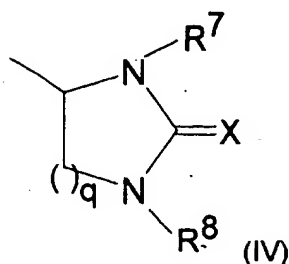
bedeutet, wobei R¹ eine Gruppe mit der allgemeinen Formel II



in der n die Zahl 3 oder 4 darstellt, in der R⁴ eine Gruppe mit der allgemeinen Formel III



worin p eine ganze Zahl von 1 bis 4, R⁵ Wasserstoff oder eine Alkylgruppe und R⁶ eine unsubstituierte oder substituierte Arylgruppe oder Heteroarylgruppe bedeutet, oder R⁴ einen Ring der allgemeinen Formel (IV)



in dem q die Zahl 1 oder 2, R⁷ ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe, R⁸ ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe und X ein Sauerstoff oder Schwefelatom bedeutet, darstellt,

Xxx¹ D-Nal(1), D-Nal(2), Nnal(1) oder Nnal(2),

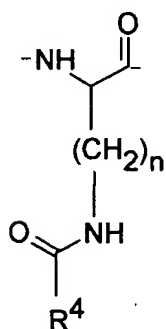
Xxx² D-(pCl)Phe oder N(pCl)phe,

Xxx³ Pal(3), D-Pal(3), Npal(2), Npal(3) oder Npal(4),

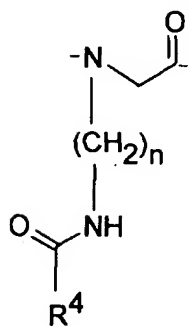
Xxx⁴ Ser, Ser(t.-But.), Hser oder Nhser,

Xxx⁵ Tyr, Tyr(t.-But.) oder Nhtyr,

Xxx⁶ D-Cit, D-Hci, Ncit, Nhcit oder eine D-Aminosäuregruppe der allgemeinen Formel (VI) oder (VII)



(VI)

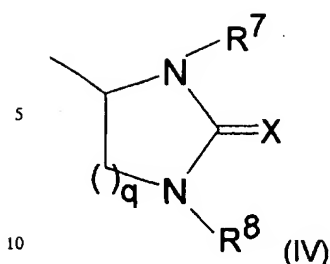


(VII)

in denen n die Zahl 3 oder 4 bedeutet, darstellt, wobei R⁴ eine Gruppe mit der allgemeinen Formel III,

-(CH₂)_p-CO-NR⁵R⁶ (III)

worin p eine ganze Zahl von 1 bis 4, R⁵ Wasserstoff oder eine Alkylgruppe und R⁶ eine unsubstituierte oder substituierte Arylgruppe oder Heteroarylgruppe bedeutet, oder R⁴ einen Ring der allgemeinen Formel (IV)



in dem q die Zahl 1 oder 2, R⁷ ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe, R⁸ ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe und X ein Sauerstoff- oder Schwefelatom bedeutet, darstellt,

- 15 Xxx⁷ Leu, D-Leu oder Nleu,
 Xxx⁸ Arg, Lys(iPr), Narg oder Nlys(iPr),
 Xxx⁹ Pro und
 Xxx¹⁰ Ala oder Nala bedeutet,

- 20 und deren Salze mit pharmazeutisch akzeptablen Säuren, insbesondere die Embonate.

Unter den Verbindungen, die von den LH-RH-Antagonisten der DE 195 44 212 abgeleitet sind, sind solche besonders bevorzugt, worin Xxx⁶ D-[ε-N²-(Imidazolidin-2-on-4-yl)-formyl]-Lys, N-[ε-N²-(Imidazolidin-2-on-4-yl)-formyl]-Gly, D-[ε-N²-4-(4-Amidino-phenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl]-Lys oder N-[ε-N²-4-(4-Amidino-phenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl]-Gly bedeutet.

- 25 Weitere besonders bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen sind:

Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Nhsr⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,
 Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Nhsr⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,
 Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-Ncit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,
 30 Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nleu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,
 Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Narg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂,
 Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Nala¹⁰-NH₂ und
 Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Hsr⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-D-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Nala¹⁰-NH₂.

- 35 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können zur Behandlung hormonabhängiger Tumore, insbesondere Prostatacarcinom oder Brustkrebs, sowie für nicht-maligne Indikationen, deren Behandlung eine LH-RH-Hormonsuppression erfordert, verwendet werden. Dazu werden sie mit den üblichen Träger- und Hilfsstoffen vermischt und als Arzneimittel konfektioniert.

Im folgenden wird die Herstellung von N-substituierten Glycinderivaten geschildert.

- 40 Bis auf Prolin, für das es kein entsprechendes analoges Glycinderivat gibt, und Nala, das gleichbedeutend mit N-methyliertem Glycin (Sarcosin) ist, werden die acht N-substituierten Glycinderivate, die zur Darstellung der Verbindungen nach Formel V benötigt werden, erst in Lösung synthetisiert und dann als Fmoc-geschützte Derivate in Festphasensynthesen eingesetzt. Zu ihrer Darstellung werden erfindungsgemäß zwei Synthesemöglichkeiten angewendet, die direkte Alkylierung und die reduktive Aminierung.

- 45 Prinzipiell können alle N-substituierten Glycinderivate durch direkte Alkylierung von primären Aminen mit Bromessigsäureestern in Toluol dargestellt werden. Bei dem hier beschriebenen Verfahren kommt es jedoch immer auch zu Dialkylierungen. Daher stellt die reduktive Aminierung eine Alternative dar, bei der gerade wasserlösliche Amine mit Glyoxylsäure-Monohydrat ohne Bildung von Nebenprodukten umgesetzt werden können. N-substituierte Glycinderivate mit unpolaren Seitenketten werden jedoch am einfachsten durch direkte Alkylierung dargestellt. Auf diese Art werden die Derivate Nnal(1), N(pCl)phe, Npal(n) (mit n = 2, 3, 4), Nleu und Norn(Boc) synthetisiert. Von dem Baustein Nnal wird die konstitutionsisomere, in Position 1 des Naphthylrings substituierte Verbindung dargestellt, da 1-Naphthylmethylamin im Gegensatz zu 2-Naphthylmethylamin käuflich ist. Wie das Nnal(2)-Derivat synthetisiert wird, ist weiter unten im Text beschrieben.

- Als Alkylierungsreagenzien werden bromierte Säureester anstelle der Chlorverbindungen verwendet, wodurch sich der Anteil an gebildetem Amid und dialkylierter Verbindung vermindern läßt. Teure oder schwer zugängliche primäre Amine werden im Verhältnis 1 : 1 mit dem Bromessigsäureester umgesetzt, wobei man zum Abfangen des entstehenden Bromwasserstoffs ein Äquivalent Triethylamin zugeben muß. Die Reaktionsführung in Abwandlung einer Vorschrift von H. C. Stewart, Austr. J. Chem. 1961, 14, 654-656 unter Eiskühlung ergibt dabei deutlich bessere Ausbeuten an N-alkyliertem Glycinester. Statt einer destillativen Reinigung der sehr schwer flüchtigen Substanzen, die immer auch zur Zersetzung des Produktes führt, können die dialkylierten Verbindungen und Nebenprodukte durch Flash-Chromatographie abgetrennt werden.

- Ist das primäre Amin dagegen ein billiges Edukt oder leicht zugänglich, so kann es in deutlichem Überschuß eingesetzt werden. Die Reaktionsführung erfolgt dabei analog einer Vorschrift zur Darstellung von PNA-Monomeren, bei der 1,2-Diaminoethan mit Bromessigsäureethylester zum Aminoethylglycinester umgesetzt wird (B. Lioy, Dissertation 65 1997, Technische Universität München). Durch den großen Überschuß des Amins (9 Äquivalente) erhält man fast ausschließlich das gewünschte monoalkylierte Produkt. Überschüssiges Amin kann destillativ entfernt werden und das bei der Reaktion entstehende Alkylammoniumbromid durch wäßrige Aufarbeitung abgetrennt werden. Es empfiehlt sich dabei, nur frisch destillierte bzw. neu gekaufte Amine zu verwenden. Anderenfalls muß durch Flash-Chromatographie ge-

reinholt werden, damit die für diese Synthesen eingesetzten Amine ausreichend rein sind.

Die Ethylester von Nnal(1) und N(pCl)phe werden mit wäßriger 1N LiOH-Lösung verseift und anschließend mit Fmoc-Cl N-terminal geschützt. Die Darstellung der Fmoc-geschützten Npal-Derivate erfolgt auf einem anderen Weg, der unten ausführlich beschrieben ist. Die N-substituierten Glycinderivate Nleu und Norn(Boc) können beide in höheren Ausbeuten durch reduktive Aminierung dargestellt werden, so daß die Ethylester dieser Verbindungen nicht für weitere Synthesen verwendet werden.

Die Darstellung des Nnal(2)-Derivats erfolgt nicht durch direkte Alkylierung, da das benötigte 2-Naphthylmethylamin nicht käuflich ist. Ausgehend vom 2-Naphthylmethanol sind jedoch mehrere Darstellungsmöglichkeiten denkbar. Durch eine Mitsunobu-Reaktion des Alkohols mit einem 2-Nitrophenylsulfonylglycinmethylester wird das entsprechend geschützte Glycinderivat nach Flash-Chromatographie erhalten. Der Methylester wird mit 1N LiOH-Lösung verseift und das Derivat 2-Nbs-Nnal(2)-OH in die Festphasensynthese eingesetzt.

Die Glycinderivate mit polaren Seitenketten können durch reduktive Aminierung aus Glyoxylsäure-Monohydrat und den entsprechenden Aminen im Autoklaven bei hohen Wasserstoffdrücken (50–70 bar) in meist quantitativer Ausbeute synthetisiert werden. Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt zweckmäßig erst nach Darstellung der Fmoc-Derivate. Aber auch Glycinderivate mit unpolaren Seitenketten können durch reduktive Aminierung dargestellt werden, allerdings meist nur in Ausbeuten um 60–70%. Da die unpolaren Amine nicht mehr in Wasser löslich sind, muß man zu Methanol als Lösungsmittel oder zu Lösungsmittelgemischen aus Methanol/Essigsäureethylester übergehen.

Funktionelle Gruppen der Seitenketten müssen vor der reduktiven Aminierung mit permanenten Schutzgruppen versehen werden, die zum einen zur Fmoc-Taktik und gleichzeitig unter den reduktiven Bedingungen orthogonal sind. Analog zur Fmoc/tert.-Butyl-Taktik in der Peptidchemie werden auch bei Synthesen von Peptiden, die N-substituierte Glycinderivate als Baustein enthalten, säurelabile, permanente Schutzgruppen verwendet. Die Hydroxygruppen der N-substituierten Glycinderivate Nhsr und Nhtyr werden durch tert.-Butyl- bzw. tert.-Butyldimethylsilylether, die Guanidinfunktion von Narg durch zwei Boc-Gruppen (N^ε, N^ω) geschützt. Die Harnstoffeinheit des Ncit-Derivates muß wegen der geringen Reaktivität unter den Reaktionsbedingungen nicht geschützt werden.

Im folgenden wird auf die Synthese einzelner N-substituierter Glycinderivate genauer eingegangen.

Synthese von Nhsr- und Nhtyr-Derivaten

Zu den Aminosäuren Serin und Tyrosin analoge Glycinderivate sind chemisch instabil und müssen daher ihrer Seitenkette um eine Methyleinheit verlängert werden. Die Glycinderivate Nhsr und Nhtyr korrespondieren in diesem Fall mit ihren homologen Aminosäuren. Genaue Vorschriften zur Darstellung dieser beiden Bausteine sind in der Literatur nicht beschrieben, so daß eigene Wege erarbeitet wurden. Zuerst wurden tert.-Butylether geschützte Derivate durch eine fünfstufige Synthese dargestellt. Schließlich konnte eine nur dreistufige Synthese für das Silylether-geschützte Nhsr-Derivat gefunden werden. Im folgenden werden beide Darstellungsmethoden beschrieben.

Bei den tert.-Butylether-geschützten Derivaten von Nhsr und Nhtyr wird die Hydroxygruppe der benötigten Amine, 2-Hydroxyethylamin (Ethanolamin) bzw. 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylamin (Tyramin) vor der reduktiven Aminierung mit Glyoxylsäure geschützt. So kann das Problem der gleichzeitig vorliegenden freien Carboxyl- und Hydroxylgruppe umgangen werden. Im Vergleich dazu muß bei der Synthese der tert.-Butylether-geschützten Fmoc-Derivate des Serins und des Tyrosins die Carboxylgruppe erst temporär als Methyl- oder Benzylester geschützt werden (J. G. Adamson et al., J. Org. Chem. 1991, 56, 3447–3449).

Die Hydroxylgruppen werden nach einer Vorschrift von (A. Armstrong et al., Tetrahedron Lett. 1988, 29, 2483–2486) mit 2,2,2-Trichloracetimidäure-tert.-butylester in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Dichlormethan und Cyclohexan unter Zugabe katalytischer Mengen BF₃ · Etherat verethert. Die Ausbeuten sind dabei stark von der Polarität der verwendeten Lösungsmittelgemische abhängig und erniedrigen sich mit steigendem Dichlormethangehalt, da dadurch die Zersetzung des Acetimidats in das entsprechende Acetamid beschleunigt wird. Die wasserlöslichen, primären Amine Ethanolamin bzw. Tyramin werden zuvor durch Einführung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Z-Gruppe) geschützt und dadurch in unpolaren Lösungsmitteln löslich gemacht. Nach der Veretherung werden die Produkte durch Flash-Chromatographie gereinigt und der N-Benzyloxycarbonyl-1-aminoethyl-2-tert.-butylether und das N-Benzyloxycarbonyl-[2-(4-tert.-butoxyphenyl)ethylamin erhalten.

Die Z-Schutzgruppe wird bei geringem Wasserstoffüberdruck (Ballon) abgespalten und das freigesetzte primäre Amin ohne weitere Isolierung im Autoklaven bei pH 6 mit Glyoxylsäure-Monohydrat reduktiv aminiert.

Die Glycinderivate H-Nhsr(tBu)-OH und H-Nhtyr(tBu)-OH werden ohne weitere Reinigung mit Fmoc-Cl zu den entsprechenden N-terminal geschützten Derivaten umgesetzt (siehe unten).

Eine nur dreistufige Synthese und damit ein wesentlich einfacherer Zugang zu dem Seitenketten-geschützten Nhsr-Derivat kann durch die Verwendung von Silylethergruppen erreicht werden. Dabei wird die monomere Grundstruktur wiederum durch reduktive Aminierung aufgebaut. Anschließend wird der N-Terminus durch Einführung der Fmoc-Gruppe geschützt und Fmoc-Nhsr-OH nach zwei Stufen erhalten. Die Hydroxygruppe kann selektiv silyliert werden, wobei sich eine Vielzahl an Silylschutzgruppen mit abgestufter Säure- und Basenstabilität anbieten (S. Hanessian et al., Can. J. Chem. 1975, 53, 2975–2977). Die tert.-Butyldimethylsilylgruppe (TBDMS) ist für die basischen Kupplungs- und sauren Abspaltbedingungen vom TCP-Harz ausreichend stabil und kann durch TBDMS-Cl und einer tertiären Base eingeführt werden. Die Carboxylgruppe wird zwar gleichzeitig neben der Hydroxyfunktionalität silyliert, jedoch ist der entstehende Silylester so säurelabil, daß er bereits durch das Kieselgel bei der Reinigung durch Flash-Chromatographie hydrolysiert wird. Auf diese Art wird Fmoc-Nhsr(TBDMS)-OH erhalten.

Synthese von Norn-Derivaten

Citrullin und Arginin sowie ihre entsprechenden N-substituierten Analoga unterscheiden sich in der Seitenkette nur in der funktionellen Gruppe, die beim Citrullin aus einer Harnstoff- und beim Arginin aus einer Guanidineinheit besteht.

Beide Aminosäuren besitzen den gleichen, aus fünf Kohlenstoffatomen bestehenden Grundkörper des Ornithins, aus dem sie aufgebaut werden können (A. S. Verdini et al., *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 6541–6542). Die Synthese der N-substituierten Glycinderivate Ncit und Narg wird daher auf die gemeinsame Vorstufe Norn zurückgeführt.

Zu Ornithin analoge Glycinderivate können entweder durch direkte Alkylierung von monogeschütztem 1,3-Diaminopropan mit Bromessigsäureestern analog einer Vorschrift von J. A. W. Kruijtz et al., *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 6969–6972, oder durch reduktive Aminierung dargestellt werden. Die Synthese der Norn-Verbindungen erfolgt damit analog zur Darstellung des um eine Methylen-Gruppe kürzeren Aminoethylglycins, das die Rückgrateinheit eines PNA-Monomers darstellt und für das es mehrere literaturbekannte Darstellungsmethoden (O. Buchardt et al., Patentanmeldung PCT/EP92/O 1219) gibt. Beide Verfahren werden zur Synthese von Norn-Derivaten angewandt. Die aufwendigere Synthese durch reduktive Aminierung bietet den Vorteil, daß jedes Zwischenprodukt komplett orthogonal geschützt ist. Boc-geschütztes β -Alanin wird mit N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid und PPA als Kupplungsreagenz in das entsprechende Weinreb-Amid überführt. Mit Lithiumaluminiumhydrid erfolgt die Reduktion zum Aminosäurealdehyd, der wegen seiner Instabilität gleich mit Glycinmethylester-Hydrochlorid bei geringem Wasserstoffüberdruck (Ballon) reduktiv aminiert wird. Das Glycinderivat H-Norn(Boc)-OMe wird über zwei Stufen erhalten. Anschließend wird das sekundäre Amin durch die Benzyloxycarbonylgruppe (Z-Gruppe) geschützt und der komplett orthogonal geschützte Baustein Z-Norn(Boc)-OMe auf dieser Synthesestufe durch Flash-Chromatographie gereinigt. Die Boc-Schutzgruppe der Seitenkette wird mit HCl-Ether quantitativ abgespalten. Dieses Norn-Derivat wird, wie unten beschrieben, in der Seitenkette zum Narg- oder Ncit-Derivat funktionalisiert.

Synthese von Z-Ncit-OMe

In der Literatur sind mehrere Synthesen für symmetrische und unsymmetrische Harnstoffe beschrieben. Dabei werden Amine mit Phosgen oder Phosgen-Äquivalenten (H. Eckert et al., *Angew. Chem.* 1987, 99, 922–923) zu Isocyanaten (P. Majer et al., *J. Org. Chem.* 1994, 59, 1937–1938, K. Burgess et al., *Angew. Chem.* 1995, 107, 975–977) oder mit Bis(4-Nitrophenyl)carbammat (J. Izdebski et al., *Synthesis* 1989, 423–425) bzw. para-Nitrophenylchlorformiat (S. M. Hutchins et al., *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 4055–4058) aktiviert und anschließend mit einem weiteren oder dem gleichen Amin zum Harnstoff-Derivat umgesetzt. Zur Darstellung von monoalkylierten Harnstoffverbindungen wird das Amin mit Kaliumcyanat oder, aufgrund der besseren Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, Trimethylsilylisocyanat (P. Boden et al., *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1664–1675) umgesetzt. Anschließend wird die Si-N-Bindung durch Wasserzugabe hydrolysiert. Auf diesem Weg wird Z-Ncit-OMe erhalten.

Da die mehrstufige Synthese des Edukts (Z-Norn-OMe) aufwendig ist, wurde zur Darstellung des Ncit-Peptidmonomers eine kürzere Synthese erarbeitet, deren Schlüsselschritt wiederum die reduktive Aminierung eines 1,3-Diaminopropan-Derivates mit Glyoxylsäure-Monohydrat ist. Die Synthesen dieses und anderer "funktionalisierter" 1,3-Diaminopropane wird im folgenden näher beschrieben.

Für die Submonomer-Festphasensynthese benötigt man zur Darstellung der Glycinderivate Norn, Narg und Ncit monogeschützte bzw. an einer Amin-Gruppe funktionalisierte 1,3-Diaminopropan-Derivate. N-Boc- bzw. N-Z-1,3-Diaminopropane dienen als Bausteine für die Synthese von Spermidinanaloge und es gibt zu ihrer Darstellung mehrere literaturbekannte Vorschriften (P. Boden et al., *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1664–1675; R. J. Bergeron et al., *J. Org. Chem.* 1987, 52, 1700–1703; M. S. Bernatowicz et al., *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2497–2502; M. S. Bernatowicz et al., *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 3389–3392; Y. F. Yong et al., *J. Org. Chem.* 1997, 62, 1540–1542; A. P. Krapcho et al., *Synth. Commun.* 1990, 20, 2559–2564; W. Hu et al., *Helv. Chim. Acta*, 1996, 79, 548–559; G. J. Atwell et al., *Synthesis* 1984, 1032–1033).

P. Boden et al., s.o., gelang die Darstellung von (7-Aminoheptyl)harnstoff ausgehend von 1,7-Diaminopropan auch ohne vorherigen Schutz einer Amin-Gruppe. Dabei erfolgte die Umsetzung mit einem dreifachen Überschuß Diamin in verdünnter Lösung. Um Nebenreaktion zu unterdrücken und um in konzentrierten Lösungen arbeiten zu können, wurde jedoch nicht auf den N-terminalen Schutz einer Amin-Gruppe verzichtet.

Die funktionalisierten Diamine können außer in der Submonomer-Festphasensynthese auch, wie oben beschrieben, durch direkte Alkylierung oder reduktive Aminierung zu den N-substituierten Glycinderivaten umgesetzt werden. Im Fall einer reduktiven Aminierung mit Glyoxylsäure-Monohydrat ist das funktionalisierte N-Z-1,3-Diaminopropan-Derivat vorzuziehen, da die Z-Schutzgruppe hydrogolytisch abgespalten und das freigesetzte Amin ohne Isolierung weiter umgesetzt werden kann.

Die Darstellung von N-Z-1,3-Diaminopropan ist nach G. J. Atwell et al., s.o., möglich. Das entsprechende N-Boc-Derivat kann nach einer Vorschrift von W. Hu et al., s.o., synthetisiert werden. Zu einem achtfachen Überschuß von 1,3-Diaminopropan in Dioxan wird eine Lösung tert.-Butyloxycarbonylanhydrid in Dioxan getropft. Überschüssiges 1,3-Diaminopropan wird anschließend destillativ entfernt, 1,3-Bis-Boc-Diaminopropan kann bei der wäßrigen Aufarbeitung abgetrennt werden, so daß das Mono-Boc-1,3-Diaminopropan in hoher Reinheit und mit hoher Ausbeute erhalten wird.

3-Z- bzw. (3-Boc-3-Aminpropyl)harnstoff können durch Umsetzung von N-Z- bzw. N-Boc-1,3-Diaminopropan in einem essigsauren Ethanol/Wasser-Gemisch mit Kaliumcyanat unter Rückfluß in 94% Ausbeute bzw. 84% Ausbeute erhalten werden. Die Boc-Schutzgruppe wird anschließend mit HCl-Ether entschützt und (3-Aminopropyl)harnstoff mit Glyoxylsäure-Monohydrat zum Ncit-Peptidmonomer reduktiv aminiert.

Synthese von Z-Narg(Boc)₂-OMe

Die Guanidingruppe der Narg-Derivate wird ähnlich wie die Harnstoffgruppe des Ncit-Derivates auf der Stufe des Norn-Bausteins Z-Norn-OMe-HCl eingeführt. Für die Guanilylierung von Aminen sind aus der Literatur mehrere Reagenzien bekannt (R. J. Bergeron et al., *J. Org. Chem.* 1987, 52, 1700–1703, M. S. Bernatowicz et al., *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2497–2502, M. S. Bernatowicz et al., *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 3389–3392, Y. F. Yong et al., *J. Org. Chem.* 1997, 62, 1540–1542), von denen die vorteilhaft sind, die im Hinblick auf den weiteren Reaktionsverlauf bereits geschützte Guanidinogruppen übertragen. In der vorliegenden Erfindung wurde N,N'-Bis(tert.-butyloxycarbonyl)-S-methylisothio-

harnstoff verwendet, um Z-Narg(Boc)2-OMe darzustellen. Dieses Guanylierungsreagenz wurde nach einer Vorschrift von R. J. Bergeron et al. (s.o.) ausgehend von S-Methylisothioharnstoff-Semisulfat durch Umsetzung mit 2.2 Äquivalenten tert.-Butyloxycarbonylanhydrid (Boc₂O) in 73% Ausbeute dargestellt. Das Bis-Boc-geschützte Guanylierungsreagenz ist um ein Vielfaches reaktiver als das entsprechende ungeschützte Derivat.

Die Reaktionsbedingungen für Guanylierungen variieren in der Literatur in Bezug auf das Lösungsmittel, die Reaktionsdauer und die Temperatur und hängen von der Reaktivität der entsprechenden Amine ab. Für die Guanylierung von Z-Norn-OMe · HCl hat sich die Vorschrift von A. S. Verdini et al. (s.o.) bewährt, bei der die Umsetzung mit dem obigen Guanylierungsreagenz in einem Lösungsmittelgemisch aus DMSO und einer 40%igen methanolischen Triton-B-Lösung (Benzyltrimethylammoniumhydroxid) erfolgt. Der komplett orthogonal geschützte Baustein Z-Narg(Boc)2-OMe wird nach chromatographischer Reinigung erhalten. Z-Narg(Boc)2-OMe wird in drei weiteren Schritten in das Fmoc-Derivat überführt (siehe unten).

Darstellung der Fmoc-Glycinderivate

Die Fmoc-Gruppe wird nach der Methode von L. A. Carpino et al. durch Fmoc-Cl in Dioxan/Wasser-Mischungen in Gegenwart von Natriumcarbonat als schwache Base in die Bausteine eingeführt (L. A. Carpino et al., J. Org. Chem. 1972, 37, 3404–3409, C. D. Chang, J. Meienhofer, Int. J. Protein Res. 1978, 11, 246–249, C. D. Chang et al., Int. J. Protein Res. 1980, 15, 59–66). Diese Darstellung gelingt jedoch nur bei Bausteinen, die in dem basischen Lösungsmittelgemisch löslich sind.

Zur Darstellung des Fmoc-Narg-Derivates muß Z-Narg(Boc)2-OMe erst N- und C-terminal entschützt werden. Dabei zeigt sich, daß die Z-Schutzgruppe nicht in Gegenwart des Methylesters abgespalten werden kann. Nach der Verseifung wird sie jedoch unter Standardreaktionsbedingungen mit Wasserstoff (Ballon) entfernt.

Das Glycinderivat H-Nnal(1)-OH ist in wäßriger Natriumcarbonat Lösung unlöslich. In diesem Fall gelingt die Einführung der Fmoc-Gruppe durch das Verfahren von D. R. Bolin et al., Int. J. Pept. Protein Res. 1989, 33, 353–359. Der Baustein H-(1)Nnal-OH wird durch intermediäre Bis-Silylierung mit TMS-Cl in Gegenwart von Triethylamin in DCM unter Rückfluß gelöst und anschließend mit Fmoc-Cl umgesetzt. Nach wäßriger, salzsaurer Aufarbeitung, bei der der Silylester hydrolysiert, wird Fmoc-(1)Nnal-OH erhalten.

Die Darstellung der Fmoc-Npal(n)-Derivate (n = 2, 3, 4) ausgehend von den C-terminal ungeschützten Monomerbausteinen gelang mit keiner der oben beschriebenen Methoden. Daraufhin wurde die Schutzgruppentaktik umgestellt und anstatt des Ethyl- der tert.-Butylester synthetisiert. Durch Umsetzung der Aminomethylpyridine mit Bromessigsäure-tert.-butylester werden die Npal-Derivate erhalten. Die Ausbeute bei dieser direkten Alkylierung kann im Fall des Npal(3)-Esters durch den neunfachen Überschuß an Aminkomponente auf 91% gesteigert werden. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

Die isomeren Npal-Bausteine müssen durch Flash-Chromatographie gereinigt werden. Die Npal-tert.-Butylester können anschließend problemlos mit Fmoc-Chlorid in Dioxan und Collidin als Base N-terminal geschützt und durch Flash-Chromatographie gereinigt werden. Die Ausbeute der Npal-Verbindungen ist geringer, wenn das Rohprodukt der ersten Reaktion umgesetzt wird. Die Abspaltung der tert.-Butylester erfolgt durch TFA und Scavenger-Zusatz mit mehr als 95% Ausbeute. m-Kresol kann aufgrund des hohen Siedepunktes nicht abdestilliert werden, so daß sich die leichter flüchtigen Trialkylsilane (Triethylsilan, etc.) als Zusatz bewährt haben.

Synthese N- und C-terminal modifizierter N-substituierter Glycinderivate

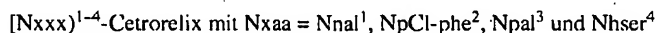
Die N- und C-terminalen Endgruppen sind bei linearen Peptoiden aufgrund der Retrosequenz im Vergleich mit den entsprechenden linearen Peptiden vertauscht. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Ladungsverhältnisse, die die Bindung an den Rezeptor beeinträchtigen können. Da im Fall der LH-RH-Antagonisten die Endgruppen eine wichtige Rolle bei der Bindung an den Rezeptor spielen, wird ein C-terminal modifiziertes Nnal bzw. ein N-terminal modifiziertes Sarcosin-Derivat synthetisiert. Diese Bausteine sind isoster mit den natürlich vorkommenden Endgruppen.

Die C-terminale Amidfunktion des Alanins wird durch eine Harnstoffgruppe des N-terminalen Sarcosins im Peptoid wiedergegeben. Die Synthese dieser Sarcosin-Verbindung erfolgt analog zur Darstellung des Ncit-Derivates. Sarcosinmethylester-Hydrochlorid wird mit Trimethylsilylisocyanat in THF umgesetzt und anschließend durch Wasserzugabe zum Harnstoff-Derivat hydrolysiert.

Synthese des Aminoketons Boc-Nnal(1)-CH₃

Der Baustein H-Nnal(1)-OH wird mit tert.-Butyloxycarbonylanhydrid N-terminal geschützt und mit N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid und Propanphosphonsäureanhydrid als Kupplungsreagenz in das Weinreb-Amid überführt. In einer Grignard-Reaktion wird das Boc-Nnal(1)-Weinreb-Amid mit Methylmagnesiumchlorid zum Aminoketon umgesetzt.

Für die Synthese von erfindungsgemäßen Verbindungen gemäß allgemeiner Formel V, z. B. Cetorelix-Analoga, werden an einer Festphase bzw. in Lösung Fragmente hergestellt, die anschließend an einer Festphase durch Segmentkupplung verbunden werden. Dabei können Fragmente mit Ketten von drei, vier oder sieben Aminosäuren verwendet werden, die nach den Schemata 3 + 7, [(3+4)+3] und 7 + 3 gekuppelt werden können. Im einzelnen werden in der vorliegenden Erfindung folgende, an den Cetorelix-Analoga beispielhaft gezeigte Strategien verfolgt:



Zuerst erfolgt eine Synthese der Heptapeptide aus den Bausteinen 1 bis 7 durch Kupplung der Aminosäuren und Glycinderivate am TCP-Harz. Anschließend wird ein Segmentkupplung der Heptapeptide mit dem C-terminalen Tripeptid

H-Arg(HCl)⁸·Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ · HCl in Lösung durchgeführt.

[Ncit]⁶-Cetorelix

Zuerst erfolgt eine Segmentkupplung des N-terminalen Tripeptids Ac-D-Nal¹-D-pCl-Phe²-D-(3-Pal)³-OH an das Tetrapeptid aus den Bausteinen 4 bis 7, das wiederum aus einzelnen Aminosäuren und dem Glycinderivat am TCP-Harz aufgebaut wird, anschließend die Verlängerung zum Decapeptid durch Segmentkupplung mit dem C-terminalen Tripeptid in Lösung.

[Nxaa]⁷⁻⁸-Cetorelix mit Nxaa = Nleu⁷ und Narg⁸

Die C-terminalen Heptapeptide H-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-[Nxaa]ⁿ-Xaa^{n±1}-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ (n = 7 und 8) werden am Rink-Amid S-RAM TentaGel[®]-Harz aufgebaut und anschließend an der Festphase durch Segmentkupplung mit dem Tripeptid Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-OH zum Decapeptid verlängert.

[Nala]¹⁰-Cetorelix

Das C-terminale Tripeptid H-Arg(Pbf)⁸-Pro⁹-Nala¹⁰-NH₂ wird am Rink-Amid S-RAM TentaGel[®]-Harz aufgebaut und anschließend an der Festphase mit dem Heptapeptid Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-OH durch Segmentkupplung verlängert.

Soweit bei diesen und anderen Synthesen geschütztes oder ungeschütztes Ser(tBu) und Tyr(tBu) benötigt werden, sind diese kommerziell erhältlich.

Synthese der Cetorelix-Analoga

Die Peptide werden am TCP-Harz der Fmoc/tBu/TBDMS-Taktik folgend synthetisiert. Der Aufbau der Peptide erfolgt wie oben in der Synthesestrategie beschrieben wurde. Die linearen Heptapeptide Ac-Xaa⁽¹⁻⁶⁾⁻ⁿ-Nxaaⁿ-OH (n = 1-6) werden ohne Reinigung weiter umgesetzt. Die Kupplung der N-Acylaminosäuren erfolgt mit TBTU/HOBt in Kombination mit DIPEA. Bei der Kupplung an ein N-substituiertes Glycinderivat wird HATU/HOAt und Collidin (pH-Wert = 7.5-8.0) verwendet. Zur Herstellung des [Ncit]⁶-Heptapeptids wird das N-terminale Tripeptid Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-OH mit dem Harz-gebundenen Tetrapeptid H-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-Ncit⁶-Leu⁷-O-TCP umgesetzt. Als Kupplungsreagenzien werden EDCI · HCl und HOObt verwendet.

Die Segmentkupplungen in Lösung werden ebenfalls mit der Kombination EDCI · HCl und HOObt (3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin) als Aktivierungsreagenzien und N-Methylmorpholin als Base (pH-Wert = 5.5-6.0) in DMF durchgeführt. Mit HOObt als Additiv kann die Racemisierung der aktivierten C-terminalen Aminosäure – dem größten Problem bei Fragmentkondensationen – eingeschränkt werden. Unter den schwach sauren Kupplungsbedingungen kann das als Hydrochlorid-Salz geschützte Arginin ohne Nebenreaktionen umgesetzt werden. Die Rohpeptide werden ohne Reinigung entschützt. Die Ausbeuten der geschützten Peptid werden durch RP-HPLC Reinigung von entnommenen Proben bestimmt.

Die Entschützung der tert.-Butyl- bzw. TBDMS-Ether der Serin- und Tyrosinseitenkette erfolgt mit 70% TFA in DCM unter Zugabe von 5% Triisopropylsilan als Scavenger. Die entschützten Peptide werden durch RP-HPLC abgetrennt.

Die Cetorelix-Analoga [Nleu]⁷-, [Narg]⁸- und [Nala]¹⁰-Cetorelix werden mit 95% TFA und 5% Triisopropylsilan vom Rink-Amid S-RAM-TentaGel[®]-Harz abgespalten, wobei die Peptide komplett Seitenketten entschützt werden. Die entschützten Peptide werden wiederum durch RP-HPLC abgetrennt.

In gleicher Weise können Analoga von Antarelix und den in der DE 195 44 212 A1 aufgeführten Verbindungen hergestellt werden.

Die Erfindung betrifft demnach auch ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der obigen allgemeinen Formel V, bei dem Fragmente aus mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx^m, bei denen m eine ganze Zahl von 1 bis 10 bedeutet und Xxx¹ acetyliert ist, an einer Festphase oder in Lösung nach üblichen Verfahren aufgebaut werden, anschließend die Fragmente an einer Festphase durch Segmentkupplung verbunden werden und nach Abschluß der Kupplung die Verbindung nach Anspruch 2 mit üblichen Verfahren unter Amidierung am Baustein Xxx¹⁰ von der Festphase abgespalten wird.

Alternativ werden in diesem Verfahren

entweder ein Fragment aus den mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx¹ bis Xxx⁷, wobei Xxx¹ acetyliert ist, und ein Fragment aus den ebenfalls mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx⁸ bis Xxx¹⁰ an einer Festphase oder in Lösung nach üblichen Verfahren aufgebaut, anschließend die beiden Fragmente an einer Festphase durch Segmentkupplung verbunden und nach Abschluß der Kupplung die Verbindung der obigen allgemeinen Formel V mit üblichen Verfahren unter Amidierung am Baustein Xxx¹⁰ von der Festphase abgespalten,

oder ein Fragment aus den mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx¹ bis Xxx³, wobei Xxx¹ acetyliert ist, ein Fragment aus den ebenfalls mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx⁴ bis Xxx⁷ und ein Fragment aus den ebenfalls mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx⁸ bis Xxx¹⁰ an einer Festphase oder in Lösung nach üblichen Verfahren aufgebaut, anschließend die drei Fragmente an einer Festphase durch Segmentkupplung verbunden und nach Abschluß der Kupplung die Verbindung der obigen allgemeinen Formel V mit üblichen Verfahren unter Amidierung am Baustein Xxx¹⁰ von der Festphase abgespalten

oder ein Fragment aus den mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx¹ bis Xxx³, wobei Xxx¹ acetyliert ist, und ein Fragment aus den ebenfalls mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx⁴ bis Xxx¹⁰ an einer Festphase oder in Lösung nach üblichen Verfahren aufgebaut, anschließend die beiden Fragmente an einer Festphase durch Segmentkupplung verbunden und nach Abschluß der Kupplung die Verbindung der obigen allgemeinen Formel V

mit üblichen Verfahren unter Amidierung am Baustein Xxx¹⁰ von der Festphase abgespalten.

Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Boc-geschützte N-alkylierte Aminosäureester

5

10.0 mmol Boc-geschützter Aminosäureester, 2 mmol (0.2 eq) Tetrabutylammoniumiodid und 80 mmol (8 eq) Alkylierungsreagenz (Alkyl- bzw. Arylbromide) werden in 25 ml abs. THF gelöst und im Eisbad abgekühlt.

Daraufhin werden 30 mmol (3 eq) NaH (als Pulver) auf einmal zugegeben. Die Suspension läßt man über Nacht auf RT kommen und rührt anschließend noch für ca. drei bis vier Tage bei RT.

10

Die Reaktion (DC-Kontrolle) wird mit verdünnter Essigsäure gequenchet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der ölige Rückstand wird in Essigsäureethylester aufgenommen (5 ml/mmol). Die organische Phase wird jeweils zweimal mit 5%iger Natriumthiosulfat-Lösung, 5%iger NaHCO₃-Lösung, verdünnter Salzsäurelösung (pH = 3) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie mit Essigsäureethylester/n-Hexan-Gemischen als Eluenten gereinigt. Die N-alkylierten Boc-Aminosäureester werden in Ausbeuten zwischen 80 und 90% in Form farbloser Öle erhalten.

15

AAV 2: Nitrobenzolsulfonamid (Nbs)-geschützte N-alkylierte Aminosäureester

AAV 2.1: Darstellung von Nitrobenzolsulfonamid (Nbs)-geschützten Aminosäureestern bzw. Peptidestern

20

10.0 mmol Aminosäureester (meist als Hydrochlorid vorliegend) werden in 40 ml abs. DCM und zwei Äquivalenten TEA gelöst. Dazu gibt man 10.0 mmol 2- bzw. 4-Nitrobenzolsulfonsäurechlorid. Man läßt über Nacht bei RT rühren, filtriert das entstandene Triethylammoniumchlorid ab, wäscht mit DCM und engt das Filtrat bis zur Trockene ein. Der Rückstand wird in einem Gemisch aus Essigsäureethylester und Wasser aufgenommen, die organische Phase zweimal mit verdünnter HCl-Lösung (pH = 3) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man das Produkt in hohen Ausbeuten in Form eines weißgelben Pulvers. Aufgrund der hohen Reinheit wird das Rohprodukt nicht mehr umkristallisiert.

25

AAV 2.2: Nitrobenzolsulfonamid (Nbs)-geschützte N-alkylierte Aminosäureester bzw. Peptidester

30

5.0 mmol Nbs-geschützter Aminosäureester werden in 20 ml abs. DMF gelöst. Darin suspendiert man zwei Äquivalente K₂CO₃ und gibt 5.5 mmol (1.1 eq) Alkyl- bzw. Arylhalogenid zu. Die Reaktion ist normalerweise nach einer Stunde beendet (DC-Kontrolle) und wird durch Zugabe von Essigsäure gequenchet, wobei überschüssiges K₂CO₃ neutralisiert wird. Die Reaktionslösung wird bis zur Trockene eingeeengt und das erhaltene Öl in Essigsäureethylester aufgenommen (5 ml/mmol). Die organische Phase wird jeweils zweimal mit 5%iger NaHCO₃-Lösung, verdünnter Salzsäurelösung (pH = 3) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie mit Essigsäureethylester/n-Hexan-Gemischen als Eluenten gereinigt. Die N-alkylierten Nbs-Aminosäureester werden in Ausbeuten > 90% in Form von weißen Pulvern oder farbloser Öle erhalten.

35

40

AAV 2.3: Abspaltung der Nitrobenzolsulfonamid-Schutzgruppe

5.0 mmol Nitrobenzolsulfonamid (Nbs)-geschützter N-alkylierter Aminosäureester werden in 25 ml abs. DMF gelöst. Unter Rühren werden 1.2 Äquivalente Thiophenol und anschließend drei Äquivalente K₂CO₃ zugegeben. Man läßt das Reaktionsgemisch für 1 h bei Raumtemperatur rühren und quenchet die Reaktion durch Zugabe von verdünnter Essigsäure. Die Reaktionslösung wird bis zur Trockene eingeeengt und das erhaltene Öl in Essigsäureethylester aufgenommen (5 ml/mmol). Die organische Phase wird jeweils zweimal mit 5%iger NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie mit Chloroform/Methanol-Gemischen als Eluenten gereinigt. Die N-alkylierten Aminosäureester werden in Ausbeuten > 90% in Form von farblosen Ölen erhalten.

45

50

AAV 3: Darstellung von N-substituierten Glycinderivaten

AAV 3.1: Durch reduktive Aminierung

55

5.0 mmol der Aminkomponente und 5.5 mmol Glyoxylsäure-Monohydrat werden in 10 ml MeOH und 5 ml Wasser gelöst. Mit 2 N NaOH-Lösung wird der pH-Wert auf pH 6 eingestellt. Die Reaktionslösung wird mit 0.1 g Katalysator (10% Pd auf Kohle, Wassergehalt ca. 50%) versetzt und in einem Autoklaven bei Raumtemperatur und 50 bar Wasserstoffdruck über Nacht umgesetzt.

Anschließend wird der Katalysator über Kieselgur abfiltriert und die Reaktionslösung bis zur Trockene eingeeengt. Die im Rohprodukt enthaltenen anorganischen Salze können größtenteils durch Aufnahme des Rückstands in abs. Methanol und anschließendes Filtrieren abgetrennt werden. Auf eine weitere Reinigung kann in der Regel verzichtet werden.

60

AAV 3.2: Durch direkte Alkylierung

65

Zu 20.0 mmol des lipophilen Amins und 20.0 mmol TEA in 15 ml Toluol werden unter Eiskühlung innerhalb von 4 h 20.0 mmol Bromessigsäureethylester in 7 ml Toluol getropft. Das Reaktionsgemisch wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser mehrmals extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lö-

ungsmittel eingeengt. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie mit Essigsäureethylester/n-Hexan-Gemischen als Eluenten.

AAV 4: Darstellung von Fmoc-Aminosäuren

AAV 4.1

5.0 mmol Aminosäure werden in 15 ml 10%iger Na_2CO_3 -Lösung und 5 ml Dioxan gelöst und in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. Unter Rühren läßt man langsam eine Lösung von 5.5 mmol Fmoc-Cl in 7.5 ml Dioxan zutropfen. Die Reaktionslösung wird für eine Stunde bei 0°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird sie in 150 ml, mit Eis versetztes Wasser gegossen und zweimal mit je 150 ml kaltem Ether extrahiert. Die eiskühle, wäßrige Phase wird im Fall von tert.-Butyl-geschützten Derivaten mit 10%iger Zitronensäure auf pH 4, bei säurestabilen Derivaten mit 1N HCl auf pH 2 eingestellt. Der dabei ausgefallene weiße Niederschlag wird mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit verdünnter HCl (pH 3) und dreimal mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und das verbleibende Öl am Ölpumpenvakuum getrocknet (Rohausbeute). Viele Fmoc-AS-OH können aus Essigsäureethylester/n-Hexan kristallisiert werden.

AAV 4.2

5.0 mmol Aminosäure und 10.0 mmol TMSCl werden in 50 ml abs. DCM unter Rückfluß erhitzt. Nach 15 min werden 10.0 mmol TEA zugegeben. Es wird weitere 60 min unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlung auf 0°C werden 5.5 mmol Fmoc-Cl zugegeben und die Mischung über Nacht gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand mit 50 ml 0.01 M HCl versetzt. Extraktion mit DCM (3 mal), Waschen mit Wasser (3 mal), Trocknung über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösungsmittels liefert die Rohprodukte.

Weitere Reinigung erfolgt durch Kristallisation oder Flash-Chromatographie mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Gemischen als Eluenten.

AAV 5: Darstellung von Boc-Aminosäuren

Diese Vorschrift ist auf die meisten Aminosäuren anwendbar, auch auf unnatürliche Aminosäuren und allgemein bei Verbindungen, die eine Aminoneben einer Carboxylfunktion besitzen.

0.1 mol Aminosäure und 10.6 g (0.1 mol) Natriumcarbonat werden in 100 ml Wasser gelöst. Hierzu wird bei Raumtemperatur unter kräftigem Rühren eine Lösung von 26.2 g (0.12 mol) Di-tert.-butyldicarbonat in 200 ml Dioxan zuge tropft und 24 h gerührt. Die entstandene Suspension wird im Vakuum auf 50 ml eingeengt (Badtemperatur 30°C) mit 100 ml Wasser verdünnt und vorsichtig mit 4N Salzsäure auf pH 2–3 angesäuert. Aus der klaren Lösung (oder manchmal Suspension) wird das Produkt fünfmal mit je 100 ml Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird destillativ entfernt und das verbleibende Öl am Ölpumpenvakuum getrocknet (Rohausbeute). Viele Boc-AS-OH können aus Diethylether/n-Hexan kristallisiert werden.

AAV 6: Synthese der N-Methoxy-N-methylcarboxamide

Die N-terminal geschützte Aminosäure wird zusammen mit 1.35 eq N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid und 3 eq N-Ethylmorpholin in abs. DCM (5 ml/mmol) gelöst. Zu der im Eisbad auf 0°C abgekühlten Reaktionslösung werden langsam 1.35 eq n-Propanphosphonsäureanhydrid (PPA) (50%ig in Essigsäureethylester) zuge tropft. Man rührt 1 h bei 0°C und erwärmt über Nacht auf Raumtemperatur. Das Reaktionsgemisch wird eingeengt, der Rückstand in 5 ml/mmol Essigsäureethylester suspendiert, je dreimal mit ges. KHSO_4 , ges. NaHCO_3 und ges. NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und dem Trocknen am Ölpumpenvakuum erhält man das Weinreb-Amid in hohen Ausbeuten und großer Reinheit, so daß auf eine chromatographische Reinigung verzichtet werden kann.

AAV 7: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe in Gegenwart von Methylestern

5.0 mmol Fmoc-geschütztes Peptidderivat werden in 10 ml abs. THF gelöst. Unter Rühren werden 10 ml Dimethylethylamin zugegeben und über Nacht stehengelassen. Die Reaktionsmischung wird im Vakuum zur Trockene eingedampft (Wasserbadtemperatur auf RT). Der Rückstand wird ohne weitere Reinigung in einer neuen Peptidkupplung eingesetzt.

AAV 8: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

AAV 8.1

5.0 mmol Boc-geschütztes Peptidderivat werden in 10 ml abs. THF gelöst oder suspendiert. Zu dieser Lösung gibt man 10 ml einer bei 0°C gesättigten Lösung von Chlorwasserstoffgas in abs. Diethylether und läßt 30 min bei RT rühren (DC-Kontrolle). Die Lösung wird im Vakuum eingedampft, mit Toluol mehrmals coevaporiert und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das anfallende Produkt kann direkt weiter umgesetzt werden.

Anstelle der HCl/Diethylether-Lösung können auch 5 ml TFA verwendet werden. Sollten sich "alkylierungsempfindliche" Aromaten im Edukt befinden (vor allem Pyridinylalaninderivate, Tyrosin etc.), werden 0.5 ml Scavenger (m-Kresol, 1,2-Ethandithiol, Triethyl- oder Trisopropylsilan) zugegeben.

AAV 9: Hydrogenolytisches Entfernen der Z-Schutzgruppe

Das zu entschützende Derivat wird in einem geeigneten, möglichst polaren Lösungsmittel (z. B. Methanol) aufgenommen und mit 100 mg pro mmol Peptid Hydrierkatalysator (10% Pd auf Kohle, Wassergehalt etwa 50%) versetzt. Anschließend wird mit Wasserstoff gespült und unter leichtem Überdruck (Ballon) kräftig gerührt. Nach 0.5 h ist die Reaktion meist beendet (DC-Kontrolle), der Katalysator wird über Kieselgur abfiltriert, das Filtrat im Vakuum eingedampft (Badtemperatur unter 30°C) und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

AAV 10: Verseifung von C-terminalen Estern

1.0 mmol Ester wird in 2–10 ml MeOH, bzw. bei unpolaren Peptiden/Aminosäure-Derivaten in THF gelöst. Hierzu gibt man unter Rühren 1.5 ml (1.5 mmol) 1N Natronlauge oder 1N LiOH-Lösung. Enthält der Methylester saure funktionelle Gruppen, muß entsprechend mehr Base verwendet werden. Die Reaktion ist nach wenigen Minuten beendet (DC-Kontrolle).

a) Wird das verseifte Produkt in einer Peptidkupplung eingesetzt, werden in der Reaktionslösung 250 mg (1.7 mmol) HOBt · H₂O zur Neutralisation gelöst und engt im Vakuum zur Trockene ein. Der so erhaltene Rückstand wird als C-terminale Komponente in einer Peptidkupplung eingesetzt (AAV 11), wobei sich eine weitere Zugabe von HOBt · H₂O erübrigt.

b) Zur Isolierung der freien Säure gibt man 1 g sauren Kationenaustauscher (Aldrich, Amberlyst 15, stark sauer, H⁺-Form, ca. 4 mmol/g) zu der Reaktionslösung und rührt 5 min. Der Kationenaustauscher wird abfiltriert, mit wenig Methanol gewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingengt. Die freie Säure ist meist rein und die Ausbeute quantitativ. Sollten sich basische Gruppen (freie Amine) im Molekül befinden, ist auf die Aufarbeitung mit Kationenaustauscher zu verzichten, da das Produkt von diesem festgehalten würde.

AAV 11: Durchführung einer Peptidkupplung in Lösung

Peptidkupplungen sollten in möglichst unpolaren Lösungsmitteln erfolgen, um Nebenreaktionen zu unterbinden. Als Lösungsmittel wird bevorzugt THF eingesetzt, wenn es die Löslichkeit erfordert, THF/DMF-Gemische. Ist eine der zu kuppelnden Komponenten leichter verfügbar als die andere, kann sie in 1.2–1.5-fachen Überschuß eingesetzt werden.

5.0 mmol C-terminal freie Aminosäure oder Peptid, 5.0 mmol N-terminal freie Aminosäure oder Peptid und 760 mg (6.5 mmol) HOBt · H₂O werden in 10 ml THF (oder THF/DMF) gelöst. Die Lösung wird im Eisbad auf 0°C abgekühlt und 1.15 g (6.5 mmol) EDCI · HCl sowie 1.32 ml (12.0 mmol) NMM zugegeben. Durch weitere tropfenweise Zugabe von NMM wird ein pH-Wert von 7–8 eingestellt. Unter Rühren läßt man das Reaktionsgemisch über Nacht auf RT erwärmen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen (Wasserbadtemperatur unter 30°C) und der verbleibende Rückstand am Ölpumpenvakuum getrocknet. Bei der Aufarbeitung wird zwischen polaren und unpolaren Peptiden unterschieden.

a) Unpolare, wasserunlösliche Peptide:

Der Rückstand wird in einem Gemisch aus 20 ml Essigsäureethylester und 20 ml Wasser gelöst. Die Essigsäureethylesterphase wird zweimal mit je 20 ml HCl (pH 3), zweimal mit je 20 ml 5%iger NaHCO₃-Lösung und einmal mit 20 ml Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

b) Polare, wasserlösliche Peptide:

Der Rückstand wird in möglichst wenig (5–10 ml) Laufmittel F gelöst, und an 100 g Kieselgel (Körnung je nach Trennproblem normal oder fein, 5 cm/25 cm Säule) chromatographiert. Als Laufmittel haben sich Chloroform/Methanol-Gemische mit einem Gradienten von 20 : 1 auf 4 : 1 bewährt (DC-Kontrolle). Nach dem Einengen der Produktfraktionen wird das Peptid durch Lyophilisieren aus Wasser/tert.-Butanol isoliert. In beiden Fällen liegen die Ausbeuten der erhaltenen, meist chromatographisch einheitlichen Produkte zwischen 70% und 95%.

AAV 12: Kupplung der ersten Aminosäure an das cTrt- und Tcp-Harz

1.00 g 2-Chlortrityl-Harz wird in 15 ml abs. Dichlormethan in einem silylierten Schüttelgefäß suspendiert. Dazu gibt man 2 Äquivalente (bezogen auf die mmol Menge Chlorids des Harzes) Fmoc-geschützte Aminosäure. Nach fünf Minuten wird eine der Aminosäure äquivalente Menge DIPEA zugegeben. Die Kupplungszeit beträgt mindestens zwei Stunden. Anschließend gibt man 4 ml Methanol und 400 µL DIPEA zu und läßt für weitere 15 min reagieren. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und nach folgendem Schema gewaschen:

Lösungsmittel	Anzahl	Menge [ml]	Zeit [min]
NMP	2	20	2
DCM	5	20	2
Isopropanol	2	20	2
Methanol	2	20	2
Ether	2	20	2

Das Harz wird im Hochvakuum getrocknet und ausgewogen. Die Belegungsdichte des Harzes wird nach folgender Formel bestimmt:

$$n = \frac{m_{\text{ges}} - m_{\text{Harz}}}{MG_{\text{Xxx}} - MG_{\text{Cl}}}$$

n Mol Aminosäure am Harz [mol]

m_{Harz} Masse des eingesetzten Harzes [g]

m_{ges} Gesamtmasse des Polymers nach Ankupplung [g]

MG_{Xxx} Molmasse der Fmoc-Aminosäure minus 1 (Fmoc-Xxx-O) [g/mol]

MG_{Cl} Molmasse Chlorid [35,45 g/mol]

Bei Rink-Amid Harzen wird zuerst die Fmoc-Schutzgruppe vom Linker abgespalten und anschließend die erste Fmoc-Aminosäure unter Standard-Peptidkupplungsbedingungen gekuppelt.

AAV 13: Festphasensynthese linearer Peptide

Alle Aminosäuren werden nach folgendem Fließschema gekuppelt:

Schritt	Reagenzien	Operation	Anzahl	Zeit [min]
1	NMP	waschen	1	3
2	20 % Piperidin/DMF	entschützen	1	5
3	20 % Piperidin/DMF	entschützen	1	15
4	NMP	waschen	7	3
5	Fmoc-AS-OH	kuppeln	1	80
	DIPEA/NMP			
6	NMP	waschen	7	3
7 ^a	DCM	waschen	2	3

^a Schritt 7 ist nur dann erforderlich, wenn die Festphasensynthese über Nacht unterbrochen wird.

Das Volumen der Waschreagenzien beträgt jeweils 20 ml bezogen auf 1 g Harz.

Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Piperidin in DMF und anschließendem mehrmaligem Waschen mit N-Methylpyrrolidon (NMP) wird jeweils die nächste Aminosäure angekuppelt.

Kupplungen mit TBTU/HOBt oder HATU/HOAt (Schritt 5)

2.0 eq der benötigten Aminosäure (AS) werden in 10 ml NMP (Lösung 1), 2.0 eq HOBt (HOAt) in 5 ml NMP (Lösung 2) und 2.0 eq TBTU (HATU) in 10 ml NMP (Lösung 3) gelöst. Lösung 1 und 2 werden vereinigt und gefolgt von der TBTU (HATU)-Lösung ins Schüttelgefäß gegeben. Nach fünf Minuten Reaktionszeit wird der pH-Wert mit DIPEA (Collidin) auf 8.5–9.0 eingestellt. Die Vollständigkeit der Kupplung wird mittels Kaiser-Test überprüft.

Vor der Abspaltung des Peptids vom Harz wird die letzte Fmoc-Schutzgruppe, analog der Schritte 1–4 des Fließschemas, entfernt.

Die Abspaltung des linearen Peptids wird folgendem Fließschema entsprechend durchgeführt:

Schritt	Reagenzien	Operation	Anzahl	Zeit [min]	
1	DCM	waschen	8	3	5
2	HOAc/TFE/DCM (1:1:8)	spalten	1	60	
3	HOAc/TFE/DCM (1:1:8)	spülen	3	5	10

Die vereinigten Filtrate aus den Schritten 2 und 3 werden im Ölpumpenvakuum eingengt und durch Eintropfen in kalten Ether gefällt. Der weißgelbe Niederschlag wird abfiltriert, mehrmals mit Ether gewaschen und im Hochvakuum über P_4O_{10} getrocknet. Die meisten Peptide sind nach Abspaltung vom Harz bereits so rein, daß die Fällung in Ether nicht unbedingt notwendig ist. Statt dessen werden die Abspalllösungen zu einem Öl eingengt, mehrmals mit Toluol coevaporiert und anschließend aus tert.-Butanol/Wasser-Gemischen lyophilisiert. 15

AAV 15: Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen

0,5 mmol Peptid werden in 15 ml eines Gemisches aus 95% TFA, 2,5% Wasser und 2,5% Ethandithiol oder 95% TFA und 5% Triethylsilan gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingengt. Die reduzierte Lösung wird zu 300 ml eisgekühltem Diethylether getropft. Die Niederschlagsbildung wird bei -20°C vervollständigt und der weiße Niederschlag wird abzentrifugiert, mit Diethylether gewaschen und am Ölpumpenvakuum über P_4O_{10} getrocknet. 20
25

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie zu beschränken.

Beispiele 1 bis 8: Synthese von Nnal-Derivaten

Beispiel 1

H-Nnal(1)-OEt $C_{15}H_{17}NO_2$ 243.305 g/mol

3.14 g (20.0 mmol) 1-Naphthylmethylanilin und 3.34 g (20.0 mmol) Bromessigsäureethylester werden nach AAV 3.2 umgesetzt. 35
Ausbeute nach Flash-Chromatographie 3.66 g (15.0 mmol; 75%) als farbloses Öl ($R_f = 0.31$ (B); $R_f = 0.65$ (G)).
 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300 K): $\delta = 8.27\text{--}8.23$ [m, 1H, ArH]; 7.93–7.91 [m, 1H, ArH]; 7.90–7.79 [m, 1H, ArH]; 7.58–7.44 [m, 4H, ArH]; 4.16 [s, 2H, $C_{10}H_7CH_2NH$]; 4.12 [q, 2H, $CO_2CH_2CH_3$]; 3.40 [s, 2H, H^a]; 2.63 [bs, 1H, NH]; 1.20 [t, 3H, $CO_2CH_2CH_3$]

Beispiel 2

Fmoc-Nnal(1)-OH $C_{28}H_{23}NO_4$ 437.494 g/mol

2.68 g (11.0 mmol) H-Nnal(1)-OEt werden nach AAV 10 verseift (H-(1)Nnal-OH $C_{13}H_{13}NO_2$, 215.252 g/mol). 45
Ausbeute 1.57 g (7.3 mmol; 66%) als weißes Pulver und ohne weitere Reinigung nach AAV 4.2 zum Fmoc-Derivat umgesetzt.
Ausbeute 2.82 g (6.45 mmol; 88%) als weißes Pulver.
 k' : 6.31 (H_2O/ACN 50 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)
HPLC-MS: $[M+H]^+ = 438.0$ 50
Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis von 1 : 1.2.
 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 8.07\text{--}7.05$ [m, 15H, Fmoc-ArH]; 4.93 [s, 2H, $C_{10}H_7CH_2NH$]; 4.41–4.21 [m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH]; 3.73 [s, 2H, H^a]

Beispiel 3

Boc-Nnal(1)-OH $C_{18}H_{21}NO_4$ 315.369 g/mol

Die Darstellung erfolgt mit 1.66 g (7.71 mmol) H-Nnal(1)-OH und 1.86 g (8.52 mmol; 1.1 eq) Boc_2O nach AAV 5. 60
Ausbeute 1.74 g (5.52 mmol; 72%) als farbloses Öl ($R_f = 0.15$ Streifen (D)).
Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.3 (ermittelt aus den Integralen für die Methylengruppe des Glycinderivats).
 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $CDCl_3$, 300K): $\delta = 8.14\text{--}7.32$ [m, 7H, ArH]; 5.01 [s, 2H, $C_{10}H_7CH_2NH$]; 3.90 und 3.76 [s, 2H, H^a]; 1.50 und 1.47 [s, 9H, $OC(CH_3)_3$]

Beispiel 4

Boc-Nnal(1)-N(OCH₃,CH₃) C₂₀H₂₆N₂O₄ 358.437 g/mol

5 1.70 g (5.4 mmol) Boc-Nnal(1)-OH und 0.71 g (7.3 mmol; 1.35 eq) N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid werden nach AAV 6 umgesetzt.

Ausbeute 1.87 g (5.22 mmol; 97%) als farbloses Öl ($R_f = 0.65$ (D)).

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.6 (ermittelt aus den Integralen für die Methylengruppe des Glycinerückgrats).

10 ¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): $\delta = 8.07$ [m, 1H, ArH]; 7.96 [m, 1H, ArH]; 7.86 [m, 1H, ArH]; 7.56–7.39 [m, 4H, ArH]; 4.88 [s, 2H, C₁₀H₇CH₂NH]; 3.99 und 3.91 [s, 2H, H^a]; 3.54 [s, 3H, OCH₃], 3.10 [s, 3H, NCH₃], 1.40 [s, 9H, OC(CH₃)₃]

Beispiel 5

Boc-Nnal(1)-CH₃ C₁₉H₂₃NO₃ 313.396 g/mol

1.87 g (5.21 mmol) des Boc-Nnal(1)-Weinreb-Amids werden in 50 ml abs. THF gelöst und im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Dazu werden unter starkem Rühren 5.2 ml (15.6 mmol; 3 eq) einer 3M Methylmagnesiumchlorid-Lösung (in THF) getropft. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wird die Reaktionslösung vorsichtig auf 150 ml eines Zweiphasensystems bestehend aus gesättigter KHSO₄-Lösung und Diethylether (1 : 1, v:v) gegeben. Die organische Phase wird dreimal mit je 25 ml ges. NaHCO₃- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt.

Ausbeute 1.54 g (4.91 mmol; 94%) als farbloses Öl ($R_f = 0.74$ (D)).

25 Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.6.

Beispiel 6

H-Nnal(1)-CH₃ C₁₄H₁₆NOCl 249.740 g/mol

30 4.91 mmol Boc-Nnal(1)-CH₃ werden nach AAV 8 entschützt.

Ausbeute 99%; $R_f = 0.43$ (D).

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): $\delta = 8.28$ [dd, 1H, ArH]; 8.02–7.99 [m, 2H, ArH]; 7.80 [dd, 1H, ArH]; 7.69–7.53 [m, 3H, ArH]; 4.58 [s, 2H, C₁₀H₇CH₂NH]; 4.21 [s, 2H, H^a], 2.22 [s, 3H, COCH₃]

35

Beispiel 7

2-Nbs-Nnal(2)-OMe C₂₀H₁₈N₂O₆S 414.433 g/mol

40 0.79 g (5.0 mmol) 2-Naphthylmethanol, 1.51 g (5.5 mmol; 1.1 eq) 2-Nitrobenzolsulfonylglycinmethylester und 1.97 g (7.5 mmol; 1.5 eq) Triphenylphosphin werden in 75 ml trockenem THF gelöst und im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Dazu werden 1.2 ml (7.5 mmol; 1.5 eq) DEAD langsam zugetropft. Man läßt die Reaktionslösung über Nacht rühren und auf RT kommen. Anschließend engt man die Reaktionssuspension zu einem orangem Öl ein, nimmt den Rückstand in Essigsäureethylester auf (5 ml/mmol) und wäscht zweimal mit 5%iger NaHCO₃- und gesättigter NaCl-Lösung und trocknet über Na₂SO₄.

45 Ausbeute nach Flash-Chromatographie 2.02 g (4.87 mmol; 98%) als farbloses Öl ($R_f = 0.48$ (B), $R_f = 0.77$ (D)).

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): $\delta = 8.17$ [dd, 1H, ArH, 1.49 H₂, 7.77 H₂]; 7.98 [dd, 1H, ArH, 1.48 H₂, 7.79 H₂]; 7.93–7.78 [m, 5H, ArH]; 7.74 [s, 1H, ArH]; 7.54–7.38 [m, 2H, ArH]; 7.35 [dd, 1H, ArH]; 4.74 [s, 2H, C₁₀H₇CH₂NH]; 4.10 [s, 2H, H^a]; 3.47 [s, 3H, COOCH₃]

50

Beispiel 8

2-Nbs-Nnal(2)-OH C₁₉H₁₆N₂O₆S 400.406 g/mol

55 326.8 mg (0.789 mmol) 2-Nbs-Nnal(2)-OCH₃ werden mit 2.5 ml (3.2 eq) 1N LiOH-Lösung nach AAV 10 verseift. Ausbeute 0.29 g (0.724 mmol; 92%) als farbloses Öl ($R_f = 0.04$ (B), $R_f = 0.18$ –0.11 als Streifen (D)).

Beispiele 9 bis 11: Synthese von N(pCl)phe-Derivaten

60

Beispiel 9

H-N(pCl)phe-OEt C₁₁H₁₄NCIO₂ 227.690 g/mol

Die Darstellung erfolgt mit 2.83 g (20.0 mmol) 4-Chlorbenzylamin und 3.34 g (20.0 mmol) Bromessigsäureethylester nach AAV 3.2.

65 Ausbeute nach Flash-Chromatographie 3.06 g (13.4 mmol; 67%) als farbloses Öl ($R_f = 0.66$ (D)).

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): $\delta = 7.38$ –7.30 [ms, 4H, ArH]; 4.85 [q, 2H, COOCH₂CH₃]; 3.69 [s, 2H, NHCH₂C₆H₄Cl]; 3.28 [s, 2H, H^a]; 2.64 [bs, 1H, NH]; 1.18 [t, 2H, COOCH₂CH₃]

DE 199 41 248 A 1

Beispiel 10

H-N(pCl)phe-OH $C_9H_{10}NClO_2$ 199.637 g/mol

3.06 g (13.4 mmol) H-N(pCl)phe-OEt werden nach AAV 10 verseift.
Ausbeute 2.63 g (13.17 mmol; 98%) als weißes Pulver ($R_f = 0.0$ (D)).
Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.2.
 1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 8.07-7.05$ [m, 15H, ArH]; 4.93 [s, 2H, $C_{10}H_7CH_2NH$]; 4.41-4.21 [m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH]; 3.73 [s, 2H, H^a]

Beispiel 11

Fmoc-N(pCl)phe-OH $C_{24}H_{20}NClO_4$ 421.880 g/mol

2.00 g (10.0 mmol) H-N(pCl)phe-OH werden ohne Reinigung nach AAV 4.1 zum Fmoc-Derivat umgesetzt.
Ausbeute 3.21 g (7.61 mmol; 76%) als weißes Pulver ($R_f = 0.19-0.07$ als Streifen (D)).
k': 6.21 (H_2O/ACN 50 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)
HPLC-MS: $[M+H]^+ = 422.0$
 1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 7.90-6.97$ [m, 12H, Fmoc-ArH]; 4.50-4.44 [m, 2H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH]; 4.38 [s, 1H, Fmoc-CH₂]; 4.24 [bs, 2 H, $NHCH_2CsH_4Cl$]; 3.84 [s, 2H, H^a]

Beispiele 12 bis 18: Synthese von Npal(3)-Derivaten

Beispiel 12

H-Npal(3)-OEt $C_{10}H_{14}N_2O_2$ 194.233 g/mol

Die Darstellung erfolgt mit 2.16 g (20.0 mmol) 3-Picolylamin und 3.34 g (20.0 mmol) Bromessigsäureethylester nach AAV 3.2.
Ausbeute nach Flash-Chromatographie 3.06 g (13.4 mmol; 67%) als farbloses Öl ($R_f = 0.66$ (D)).
 1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 8.49$ [dd, 1H, 0.7 Hz/1.5 Hz, 2-H]; 8.44 [dd, 1H, 1.7 Hz/4.8 Hz, 6-H]; 7.72 [ddd, 1H, nb/1.7 Hz/7.8 Hz, 5-H]; 7.33 [ddd, 1H, 0.8 Hz/4.8 Hz/7.8 Hz, 4-H]; 4.09 [q, 2H, $CO_2CH_2CH_3$]; 3.73 [s, 2H, $NCH_2C_5H_4N$]; 3.32 [s, 2H, H^a]; 2.56 [bs, 1H, NH]; 1.19 [t, 3H, $CO_2CH_2CH_3$]

Beispiel 13

Boc-(3)Npal-OEt $C_{15}H_{22}N_2O_4$ 294.350 g/mol

1.14 g (5.87 mmol) H-Npal(3)-OEt werden ohne vorherige Reinigung nach der modifizierten AAV 5 mit 1.41 g (6.46 mmol; 1.1 eq) Boc₂O und einem Äquivalent Collidin als Base umgesetzt.
Ausbeute 1.33 g (4.52 mmol; 77%) als farbloses Öl ($R_f = 0.47$ (D)).
Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.1 (ermittelt aus den Integralen für die Methylengruppe des Glycinrückgrats).
 1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 8.49$ [d, 1H, 2-H]; 8.45 [d, 1H, 6-H]; 7.73-7.68 [m, 1H, 4-H]; 7.36-7.31 [m, 1H, 5-H]; 4.43 [s, 2H, $NCH_2C_5H_4N$]; 4.06 [q, 2H, $COOCH_2CH_3$]; 3.93 und 3.84 [s, 2H, H^a]; 1.36 und 1.33 [s, 9H, $OC(CH_3)_3$]; 1.17 [t, 3H, $COOCH_2CH_3$]

Beispiel 14

Boc-Npal(3)-OH $C_{13}H_{18}N_2O_4$ 266.297 g/mol

1.33 g (4.52 mmol) Boc-Npal(3)-OEt werden nach AAV 10 verseift.
Ausbeute 0.76 g (2.85 mmol; 63%) als weißes Pulver ($R_f = 0.13$ (D)).

Beispiel 15

H-Npal(3)-OH $C_8H_{10}N_2O_2$ 166.180 g/mol

1.78 g (8.70 mmol) H-Npal(3)-OEt werden nach AAV 10 verseift.
Ausbeute 1.45 g (8.7 mmol; 99%) als weißes Pulver ($R_f = 0.15$ (G)).
 1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 8.52$ [d, 1H, 1.6 Hz, 2-H]; 8.45 [dd, 1H, 1.6 Hz/4.8 Hz, 6-H]; 7.77 [dd, 1H, nb/7.8 Hz, 5-H]; 7.34 [dd, 1H, 4.8 Hz/7.8 Hz, 4-H]; 4.83 [bs, 2H, NH_2+]; 3.76 [s, 2H, NCH_2CsH_4N]; 2.95 [s, 2H, H^a]

Beispiel 16

H-Npal(3)-OtBu $C_{12}H_{18}N_2O_2$ 222.287 g/mol

Darstellung erfolgt mit 3.24 g (30.0 mmol) 3-Picolylamin und 5.85 g (30.0 mmol) Bromessigsäure-tert.-butylester.

Rohausbeute 6.07 g (27.3 mmol; 91%) als gelbes Öl ($R_f = 0.43$ (D)).

HPLC-MS: $[M+H]^+ = 223.0$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300K): $\delta = 8.50$ [d, 1H, 1.7 H_2 , 2-H]; 8.42 [dd, 1H, 1.7 Hz/nb H_2 , 6-H] 7.72 [m, 1H, 4-H]; 7.33 [m, 1H, 5-H]; 3.72 [s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$]; 3.19 [s, 2H, H^a]; 2.37 [bs, 1H, NH]; 1.41 [s, 9H, CO_2tBu]

Beispiel 17

Fmoc-(3)Npal-OtBu $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ 444.530 g/mol

1.33 g (5.98 mmol) H-(3)Npal-OtBu werden nach der modifizierten Vorschrift AAV 4.1 mit 1.70 g (6.58 mmol; 1.1 eq) Fmoc-Cl in Dioxan und einem Äquivalent Collidin unter Eiskühlung umgesetzt.

Ausbeute nach Flash-Chromatographie und zwei Stufen 2.04 g (4.59 mmol; 77%) als farbloses Öl.

k' : 5.59 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 30 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)

HPLC-MS: $[M+X]^+ = 445.2$

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300K): $\delta = 8.48$ –8.42 und 8.31 [m und s, 2H, 2-H und 6-H]; 7.87 [t, 2H, Fmoc-ArH]; 7.64–7.20 [m, 8H, 4-H, 5-H und Fmoc-ArH, gegenseitig überlagert]; 4.53–4.19 [m, 3H, Fmoc- CH_2 und Fmoc-CH, Urethan]; 4.22 [s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$]; 3.85 [zwei s, 2H, H^a]; 1.32 [s, 9H, CO_2tBu]

Beispiel 18

Fmoc-Npal(3)-OH $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ 388.423 g/mol

2.04 g (4.59 mmol) Fmoc-Npal(3)-OtBu werden mit TFA und m-Kresol als Scavenger entschützt. Der Scavenger muß anschließend durch Flash-Chromatographie abgetrennt werden.

Ausbeute 1.72 g (4.42 mmol; 96%) als weißes Pulver ($R_f = 0.04$ als Streifen (D); 0.58 (G)).

k' : 2.84 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 30 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)

HPLC-MS: $[M+H]^+ = 389.3$

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.1 (ermittelt aus den Integralen für die Methylengruppe des Glycinerückgrats).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300K): $\delta = 8.46$ und 8.30 [bs, 2H, 2-H und 6-H]; 7.86 [t, 2H, Fmoc-ArH]; 7.67–7.23 [m, 8H, 4-H, 5-H und Fmoc-ArH]; 4.49–4.23 [m, 5H, $\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$ und Fmoc- CH_2 , Fmoc-CH Urethan]; 3.32 [zwei s, 2H, H^a]

Beispiele 19 bis 24

Synthese von Npal(2)- und Npal(4)-Derivaten

Die isomeren Verbindungen Fmoc-Npal(2)-OH und Fmoc-Npal(4)-OH werden analog Beispiel 18 dargestellt. Tabelle 1 enthält die analytischen Daten dieser Derivate.

Tabelle 1

Analytische Daten der Npal(2)- und Npal(4)-Derivate

Beispiel	Verbindung	k'	Ausbeute	HPLC-MS
19	H-Npal(2)-OtBu	0.16 ^a	32 %	223.0
20	Fmoc-Npal(2)-OtBu	1.65 ^b	92 %	445.2
21	Fmoc-Npal(2)-OH	0.40 ^b	96 %	389.3
22	H-Npal(4)-OtBu	0.14 ^a	28 %	223.0
23	Fmoc-Npal(4)-OtBu	5.64 ^a	93 %	445.1
24	Fmoc-Npal(4)-OH	2.14 ^a	98 %	389.3

^a $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 30 \rightarrow 80% in 30 min; Nucleosil 5 μm

^b $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50 \rightarrow 80 % in 30 min; Nucleosil 5 μm

Beispiel 19

H-(Npal(2)-OtBu C₁₂H₁₈N₂O₂ 222.287 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 8.48 [dt, 1H, 0.8 Hz/4.8 Hz, 6-H]; 7.74 [td, 1H, 1.8 Hz/7.7 Hz, 5-H] 7.40 [dd, 1H, nb/7.7 Hz, H-3]; 7.26–7.21 [m, 1H, 4-H]; 3.79 [s, 2H, NCH₂C₅H₄N]; 3.25 [s, 2H, H^a]; 2.54 [bs, 1H, NH]; 1.41 [s, 9H, CO₂tBu]

Beispiel 20

Fmoc-Npal(2)-OtBu C₂₇H₂₈N₂O₄ 444.530 g/mol

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.1.
¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 8.50–8.48 [qd, 1H, 0.9 Hz/1.8 Hz/4.8 Hz, 6-H]; 7.91–7.63 [m, 4H, Fmoc-ArH und ArH, gegenseitig überlagert]; 7.48–6.92 [m, 7H, Fmoc-ArH und ArH, gegenseitig überlagert]; 4.50–4.38 [m, 4H, NCH₂C₅H₄N und Fmoc-CH₂, Urethan]; 4.26–4.20 [m, 1H, Fmoc-CH, Urethan]; 3.97 und 3.90 [zwei s, 2H, H^a]; 1.37 und 1.36 [zwei s, 9H, CO₂tBu]

Beispiel 21

Fmoc-Npal(2)-OH C₂₃H₂₀N₂O₄ 388.423 g/mol

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.1 (ermittelt aus den Integralen für die Methylengruppen des Glycinerückgrats und der Seitenkette).
¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 8.66–8.56 (dd, 1H, 6-H); 8.13–7.79 [m, 3H, ArH und Fmoc-ArH]; 7.65–7.18 [m, 8H, ArH und Fmoc-ArH]; 4.67 und 4.50 [zwei s, 2H, NCH₂C₅H₄N]; 4.42–4.16 [m, 3H, Fmoc-CH₂, Fmoc-CH, Urethan]; 4.08 und 4.03 [zwei s, 2H, H^a]

Beispiel 22

H-Npal(4)-OtBu C₁₂H₁₈N₂O₂ 222.287 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 8.47 [d, 2H, 1.6 Hz 2,6-H]; 7.31 [d, 2H, 1.6 Hz, 3,5-H]; 3.72 [s, 2H, NCH₂C₅H₄N]; 3.19 [s, 2H, H^a]; 2.56 [bs, 1H, NH]; 1.40 [s, 9H, CO₂tBu]

Beispiel 23

Fmoc-Npal(4)-OtBu C₂₇H₂₈N₂O₄ 444.530 g/mol

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.1 (ermittelt aus den Integralen der Fmoc-Aromaten-Protonen und der Methylenprotonen des Glycinerückgrats).
¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 8.49 und 8.41 [zwei d, 2H, 2,6-H]; 7.90 und 7.83 [zwei d, 2H, Fmoc-ArH]; 7.65 [d, 1H, Fmoc-ArH]; 7.47–7.20 [m, 5H, Fmoc-ArH]; 7.15 und 6.98 [zwei d, 2H, 3,5-H]; 4.48–4.44 [m, 3H, NCH₂C₅H₄N und Fmoc-CH₂, Urethan]; 4.26–4.22 [m, 2H, Fmoc-CH₂ und Fmoc-CH, Urethan]; 3.90 und 3.79 [zwei s, 2H, H^a]; 1.35 und 1.34 [zwei s, 9H, CO₂tBu]

Beispiel 25

Z-(2-tert.-butoxy)ethylamin C₁₄H₂₁NO₃ 251.325 g/mol

0.98 g (5.02 mmol) Z-Ethanolamin werden in 10 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Cyclohexan/DCM (1 : 1) unter Argon-Atmosphäre gelöst (bei größeren Ansatzmengen muß mehr DCM genommen werden). Bei RT werden unter Rühren 1.21 g (5.52 mmol; 1.1 eq) tert.-Butyltrichloracetimidat zugegeben und die Reaktion durch langsame Zugabe katalytischer Mengen BF₃ · Etherat (maximal 100 µL) aktiviert. Nach 2–3 h werden 0.42 g (5 mmol) NaHCO₃ zugegeben um die Reaktion zu quenchen. Entstandenes Trichloracetamid und anorganische Salze werden abfiltriert, das Filtrat zu einem farblosen Öl eingeeengt und das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute 1.06 g (4.22 mmol; 84%) als farbloses Öl (R_f = 0.55 (B); 0.68 (D)).

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 7.38–7.30 [m, 5H, ArH]; 7.18 [t, 1H, NH]; 5.01 [s, 2H, CH₂Ar, Urethan]; 3.30 [t, 2H, NHCH₂CH₂OtBu]; 3.07 [q, 2H, NHCH₂CH₂OtBu]; 1.11 [s, 9H, OC(CH₃)₃]

Beispiele 26 bis 28: Synthese von Nhser Derivaten

Beispiel 26

Fmoc-Nhser(tBu)-OH C₂₃H₂₇NO₅ 397.470 g/mol

Die Z-Schutzgruppe von 1.06 g (4.22 mmol) Z-NH-CH₂CH₂-OtBu wird bei einem pH-Wert von 3.5–4.0 im Autoklaven hydrogenolytisch abgespalten (R_f = 0.11 als Streifen (D)). Anschließend wird das Produkt mit 0.39 g (4.26 mmol;

1.01 eq) Glyoxylsäure-Monohydrat nach AAV 3.1 reduktiv aminiert. H-Nhser(tBu)-OH ($C_8H_{17}NO_3$ 175.228 g/mol) wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): δ = 3.52 [t, 2H, $NHCH_2CH_2OtBu$]; 3.18 [s, 2H, H^a]; 2.95 [t, 2H, $NHCH_2CH_2OtBu$]; 1.15 [s, 9H, $OC(CH_3)_3$] H-Nhser(tBu)-OH wird mit 1.10 g (4.26 mmol) Fmoc-Cl nach AAV 4.1 umgesetzt.

Ausbeute 1.17 g (2.94 mmol; 70% nach zwei Stufen) als fester, weißer Schaum (R_f = 0.25–0.11 als Streifen (D)).

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.2.

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): δ = 7.88 [d, 2H, Fmoc-ArH]; 7.73–7.60 [dd, 2H, Fmoc-ArH]; 7.45–7.28 [m, 4H, Fmoc-ArH]; 4.42 [d, 1H, Fmoc-CH₂]; 4.31–4.13 [m, 3H, Fmoc-CH₂ und Fmoc-CH, Urethan]; 4.01 und 3.89 [s, 2H, H^a]; 3.52–3.49 [t, 2H, NCH_2CH_2OtBu]; 3.37–3.22 [m, 2H, NCH_2CH_2OtBu]; 1.11 und 1.03 [s, 9H, $OC(CH_3)_3$]

Beispiel 27

Fmoc-Nhser-OH $C_{19}H_{19}NO_5$ 341.363 g/mol

1.22 g (20.0 mmol) Ethanolamin werden mit 1.93 g Glyoxylsäure-Monohydrat nach AAV 3 reduktiv aminiert. 0.70 g (ca. 5.88 mmol) Rohprodukt H-Nhser-OH ($C_4H_9NO_3$; 119.120 g/mol) werden nach AAV 4 mit 1.53 g (5.90 mmol; 1 eq) Fmoc-Cl umgesetzt.

Ausbeute 0.91 g (2.67 mmol; 45% nach zwei Stufen) als weißer Schaum.

k' : 0.77 (H_2O/ACN 50 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)

HPLC-MS: $[M+H]^+$ = 341.9

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): δ = 7.89 [d, 2H, 7.51 H_2 , Fmoc-ArH]; 7.64 [dd, 2H, 7.31 H_2 , 7.52 H_2 , Fmoc-ArH]; 7.44–7.28 [m, 4H, Fmoc-ArH]; 4.66 [bs, 1H, OH]; 4.40–4.21 [m, 3H, Fmoc-CH₂ und Fmoc-CH, Urethan]; 4.04 und 3.95 [s, 2H, H^a]; 3.51 [t, 2H, NCH_2CH_2OH]; 3.37–3.22 [m, 2H, NCH_2CH_2OH]

Beispiel 28

Fmoc-Nhser(TBDMS)-OH $C_{25}H_{33}NO_5Si$ 455.626 g/mol

0.91 g (2.67 mmol) Fmoc-Nhser-OH und 0.75 g (10.95 mmol; 4.1 eq) Imidazol werden in 7 ml DCM gelöst. Dazu wird bei 0°C eine Lösung TBDMS-Cl in 4 ml DCM langsam zugegeben. Nach 12 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung mit $MgSO_4$ versetzt und mit Hexan verdünnt. Die Suspension wird gerührt, bis die überstehende Lösung klar ist, und anschließend filtriert. Der Rückstand wird im Vakuum eingeeengt und durch Flash-Chromatographie mit $CHCl_3/MeOH$ -Gemischen als Eluenten gereinigt.

Ausbeute nach Reinigung 1.00 g (2.19 mmol; 82%) als weißer Schaum.

k' : 8.27 (H_2O/ACN 50 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)

HPLC-MS: $[M+H]^+$ = 456.0

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie in einem nicht bestimmbar Verhältnis.

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): δ = 7.88 [d, 2H, Fmoc-ArH]; 7.65 [dd, 2H, Fmoc-ArH]; 7.44–7.27 [m, 4H, Fmoc-ArH]; 4.39–4.16 [m, 3H, Fmoc-CH₂ und Fmoc-CH, Urethan]; 3.93 und 3.79 [zwei s, 2H, H^a]; 3.67 [t, 1H, NCH_2CH_2OSi]; 3.38 und 3.33 [dt, 2H, NCH_2CH_2OSi]; 3.13 [t, 1H, NCH_2CH_2OSi]; 0.85, 0.84 und 0.82 [s, 9H, $Si(CH_3)_3$]; 0.02, -0.43 und -0.58 [s, 6H, $Si(CH_3)_2$]

Beispiel 29

Z-[2-(4-tert.-butoxyphenyl)]ethylamin $C_{20}H_{25}NO_3$ 327.423 g/mol

Die Reaktion erfolgt analog der Darstellung von Z-(2-tert.-butoxy)ethylamin. Eingesetzt werden 1.44 g (5.31 mmol) Z-Tyramin und 1.28 g (5.84 mmol; 1.1 eq) tert.-Butyltrichloracetimidat. Nach Flash-Chromatographie erhält man 1.06 g (3.25 mmol; 61%) als farbloses Öl (R_f = 0.62 (B)).

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): δ = 7.34–7.30 [m, 6H, ArH, Z-Schutzgruppe, NH]; 7.19 [d, 2H, ArH]; 6.85 [d, 2H, ArH]; 4.99 [s, 2H, CH_2Ar , Urethan]; 3.18 [q, 2H, $NHCH_2CH_2OtBu$]; 2.65 [t, 2H, $NHCH_2CH_2OtBu$]; 1.25 [s, 9H, $OC(CH_3)_3$]

Synthese eines Nhtyr-Derivats

Beispiel 30

Fmoc-Nhtyr(tBu)-OH $C_{29}H_{31}NO_5$ 473.568 g/mol

Die Z-Schutzgruppe von 0.73 g (2.23 mmol) Z-[2-(4-tert.-butoxyphenyl)]ethylamin wird bei einem pH-Wert von 3.5–4.0 im Autoklaven hydrolytisch abgespalten (R_f = 0.08 als Streifen (D)). Anschließend wird das Produkt mit 0.21 g (2.25 mmol; 1.01 eq) Glyoxylsäure-Monohydrat nach AAV 3.1 reduktiv aminiert. Das nicht gereinigte H-Nhtyr(tBu)-OH wird mit 0.58 g (2.25 mmol) Fmoc-Cl nach AAV 4.1 umgesetzt.

Ausbeute 0.66 g (1.39 mmol; 63% nach zwei Stufen) als fester, weißer Schaum (R_f = (D)).

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.2.

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): δ = 7.88 [d, 2H, ArH]; 7.64 [t, 2H, Fmoc-ArH]; 7.40 [t, 2H, Fmoc-ArH]; 7.32 [t, 2H, Fmoc-ArH]; 7.08 [d, 2H, Fmoc-ArH]; 6.84 [d, 2H, ArH]; 4.45 [d, 1H, Fmoc-CH₂]; 4.29–4.18 [m, 2H, Fmoc-CH₂]

und Fmoc-CH]; 3.71 und 3.56 [s, 2H, H^a]; 3.48–3.39 und 3.13–3.07 [m, 2H, NCH₂CH₂Ar]; 2.76–2.68 und 2.39–2.32 [m, 2H, NCH₂CH₂Ar]; 1.24 und 1.22 [s, 9H, OC(CH₃)₃]

Synthese eines Nleu-Derivats

Beispiel 31

Fmoc-Nleu-OH C₂₁H₂₃NO₄ 353.417 g/mol

0.79 g (10.8 mmol) Isobutylamin werden zusammen mit 1.00 g (10.86 mmol) Glyoxylsäure-Monohydrat nach AAV 3.1 reaktiv aminierte. Die entstandene Verbindung H-Nleu-OH (C₆H₁₃NO₂, 131.175 g/mol) wird ohne weitere Reinigung mit 2.8 g (10.8 mmol) Fmoc-Cl nach AAV 4.1 umgesetzt. Ausbeute 2.40 g (6.79 mmol; 63% nach zwei Stufen) als gelbliches Öl (R_f = 0.16 als Streifen (D)).

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie im Verhältnis 1 : 1.2.

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 7.89 [d, 2H, Fmoc-ArH]; 7.64 [t, 2H, Fmoc-ArH]; 7.44–7.29 [m, 4H, Fmoc-ArH]; 4.50 [d, 1H, Fmoc-CH₂]; 4.25 [d, 1H, Fmoc-CH₂]; 4.27–4.23 [m, 1H, Fmoc-CH]; 3.93 und 3.76 [zwei s, 2H, H^a]; 3.05 und 2.68 [zwei d, 2H, H^b]; 1.84 und 1.42 [zwei m, 1H, H^c]; 0.82 und 0.52 [zwei d, 6H, H^d]

Beispiel 32

Boc-β-Ala-N(OCH₃,CH₃) C₁₀H₂₀N₂O₄ 232.280 g/mol

Die Darstellung erfolgt nach AAV 6 mit 3.78 g (20.0 mmol) Boc-β-Ala-OH. Ausbeute 4.4 g (18.9 mmol; 95%) als farbloses Öl (R_f = 0.62 (D)).

k': 2.50 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min; Nucleosil 5 μm)

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 6.72 [t, 1H, NH-Boc]; 3.64 [s, 3H, CO-NOCH₃]; 3.13 [q, 2H, NHCH₂CH₂]; 3.07 [s, 3H, CO-NCH₃]; 2.51 [t, 3H, NHCH₂CH₂]; 1.37 [s, 9H, OC(CH₃)₃].

Beispiele 33 bis 36

Darstellung von Norn-Derivaten

Beispiel 33

H-Norn(Boc)-OMe C₁₁H₂₂N₂O₄ 246.306 g/mol

4.24 g (18.25 mmol) des Boc-b-Ala-Weinreb-Amids werden in 20 ml abs. Diethylether gelöst. Zu der auf –5°C abgekühlten Reaktionslösung werden langsam 21.9 mmol (1.2 eq) einer 1M LiAlH₄-Lösung in THF getropft. Nach 15 min ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle). Durch Zugabe von 5%iger KHSO₄-Lösung wird sie gequenchet. Das dabei entstehende Al₂O₃ wird abzentrifugiert und die wäßrige Phase zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden jeweils zweimal mit ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Der resultierende Boc geschützte Aldehyd (R_f = 0.48 (D)) wird ohne weitere Reinigung und Charakterisierung mit 2.29 g (18.25 mmol) Glycinmethylester-Hydrochlorid in Methanol nach AAV 3.1 umgesetzt. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 2.99 g (36.5 mmol; 2 eq) NaOAc eingestellt. Die reduktive Aminierung erfolgt über Nacht bei geringem Wasserstoffüberdruck (Ballon). Der Palladium-Katalysator wird abfiltriert, das Lösungsmittel eingeeengt und das Öl in DCM aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels und Trocknen im Ölpumpenvakuum erhält man einen festen, weißen Schaum.

Ausbeute über zwei Stufen 3.68 g (14.94 mmol; 82%) R_f = 0.41 (D).

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 6.74 [t, 1H, NH-Boc]; 3.62 [s, 3H, COOCH₃]; 3.30 [s, 2H, H^a]; 2.94 [q, 2H, H^d]; 2.48 [überlagert mit dem [D₆]DMSO-Signal, 2H, H^b]; 1.93 [s, 1H, NH]; 1.48 [t, 2H, H^c]; 1.38 [s, 9H, OC(CH₃)₃]

Beispiel 34

H-Norn(Boc)-OEt C₁₂H₂₄N₂O₄ 260.333 g/mol

Die Darstellung erfolgt mit 1.74 g 1,3-(N-tert.-Butoxycarbonyl)-diaminopropan und 1.67 g Bromessigsäureethylester nach AAV 3.2.

Ausbeute nach Flash-Chromatographie 1.22 g (4.69 mmol; 47%) als farbloses Öl (R_f = 0.40 (D)).

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 6.74 [t, 1H, NH-Boc]; 4.08 [q, 2H, CO₂CH₂CH₃]; 3.31 [s, 2H, H^a]; 2.93 [q, 2H, H^d]; 2.49 [t, 2H, H^b]; 1.91 [bs, 1H, NH sekundär]; 1.47 [quintett, 2H, H^c]; 1.37 [s, 9H, OC(CH₃)₃]; 1.19 [t, 3H, CO₂CH₂CH₃]

Beispiel 35

Z-Norn(Boc)-OMe C₁₉H₂₈N₂O₆ 380.441 g/mol

2.46 g (10.0 mmol) H-Norn(Boc)-OMe werden zusammen mit einem Äquivalent TEA in 40 ml Toluol gelöst. An-

schließlich läßt man bei Raumtemperatur langsam 3.64 ml einer 50%igen Benzyloxycarbonylchlorid (Z-Cl) Lösung in Toluol zutropfen und für 4 h rühren. Nach dem Einengen des Lösungsmittels wird der ölige Rückstand in Essigsäure-ethylester aufgenommen, jeweils zweimal mit 5%iger KHSO_4 - und gesättigter NaCl -Lösung extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt (Rohausbeute 3.43 g; 9.02 mmol; 90%) wird durch Flash-Chromatographie gereinigt.

5 Ausbeute 2.56 g (6.73 mmol; 67%) als farbloses Öl ($R_f = 0.37$ (B); 0.72 (D)).

k' : 1.50 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50 \rightarrow 100% in 30 min. Nucleosil 5 μm)

FAB-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 381$ (19%), $[(\text{M}-\text{Boc})+\text{H}]^+ = 281$ (100%)

Die Verbindung zeigt cis/trans Isomerie im Verhältnis 1 : 1.1.

10 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300K): $\delta = 7.36\text{--}7.26$ [m, 5H, ArH]; 6.77 [t, 1H, NH-Boc]; 5.09 und 5.04 [s, 2H, PhCH_2 Urethan]; 4.05 und 4.02 [zwei s, 2H, H^a]; 3.64 und 3.60 [zwei s, 3H, COOCH_3]; 3.30–3.23 [m, 2H, H^b]; 2.93–2.91 [m, 2H, H^c]; 1.64–1.56 [m, 2H, H^d]; 1.37 und 1.35 [zwei s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$]

Beispiel 36

15 Z-Norm-OMe · HCl $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{ClO}_4$ 316.785 g/mol

2.56 g (6.73 mmol) Z-Norm(Boc)-OMe werden nach AAV 8 Seitenketten-entschützt.

Ausbeute 2.08 g (6.56 mmol; 98%) als farbloser Schaum ($R_f = 0.09$ (D); 0.55 (G)).

Die Verbindung zeigt cis/trans Isomerie im Verhältnis 1 : 1.5.

20 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300K): $\delta = 8.05$ [bs, 3H, NH_3^+]; 7.38–7.26 [m, 5H, ArH]; 5.10 und 5.05 [zwei s, 2H, PhCH_2 Urethan]; 4.10 und 4.05 [zwei s, 2H, H^a]; 3.65 und 3.61 [zwei s, 3H, COOCH_3]; 3.37–3.33 [m, 2H, H^b überlagert mit dem Wasser-Signal]; 2.78–2.76 [m, 2H, H^c]; 1.83–1.77 [m, 2H, H^d]

Beispiele 37 und 40

25

Synthese von Ncit Derivaten

Beispiel 37

30 Z-Ncit-OMe $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ 323.349 g/mol

0,795 g (2.46 mmol) Z-Norm(HCl)-OMe werden zusammen mit 1 eq TEA in 5 ml abs. THF gelöst. Dazu tropft man langsam 360 μl (2.71 mmol; 1.1 eq) Trimethylsilylisocyanat (in 2.5 ml abs. THF gelöst) und läßt für 2 h bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird 1 ml Wasser zugegeben und für weitere 2 h rühren gelassen. Das Lösungsmittel wird abdestilliert. Das resultierende Öl wird in Essigsäureethylester aufgenommen, zweimal mit 5%iger NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das nach Einengen des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Gemischen als Eluent gereinigt.

Ausbeute 0.62 g (1.92 mmol; 78%); $R_f = 0.26$ (D).

k' : 2.03 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 30 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)

40 HPLC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 324.2$

Die Verbindung zeigt cis/trans Isomerie im Verhältnis 1 : 1.2.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300K): $\delta = 7.38\text{--}7.26$ [m, 5H, ArH]; 5.92 [bs, 3H, NH und NH_2]; 5.10 und 5.05 [zwei s, 2H, Z- CH_2 , Urethan]; 4.06 und 4.03 [zwei s, 2H, H^a]; 3.65 und 3.60 [zwei s, 2H, COOCH_3]; 3.27 [m, 2H, H^b]; 2.95 [t, 2H, H^c]; 1.57 [sextett, 2H, H^d]

45

Beispiel 38

3-Boc-1,3-Diaminopropan $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ 174.243 g/mol

50 3.84 g (15.0 mmol) 3-Aminopropionitril-Fumarat werden nach AAV 5 mit 6.61 g (30.3 mmol; 1.1 eq) Boc_2O umgesetzt.

Ausbeute 4.88 g (28.7 mmol; 96%) als weißer Feststoff ($R_f = 0.61$ (D)).

$^1\text{H-NMR}$ Daten von 3-Boc-3-Aminopropionitril

55 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300K): $\delta = 7.14$ [t, 1H, NH]; 3.16 [q, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$]; 2.59 [t, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$]; 1.39 [s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$]

4.88 g (28.7 mmol) N-Boc-3-Aminopropionitril ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$, 170.211 g/mol) werden in schwach salzsaurem Methanol bei 40 bar Wasserstoffdruck und katalytischen Mengen 10%igen Pd/C-Katalysator über Nacht hydriert.

Ausbeute nach Flash-Chromatographie 2.91 (16.7 mmol; 58%) farbloses Öl ($R_f = 0.06$ (D), $R_f = 0.25$ (G)).

60 $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300K): $\delta = 6.80$ [t, 1H, NH]; 2.95 [q, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-Boc}$]; 2.51 [t, 2H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$]; 1.51 [quintett, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$]; 1.38 [s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$]

3-Boc-1,3-Diaminopropan kann in wesentlich höheren Ausbeuten entsprechend der Literaturvorschrift von W. Hu et al., *Helv. Chim. Acta*, 1996, 79, 548–559, synthetisiert werden. Ein 20.0 mmol Ansatz ergibt eine Ausbeute von 3.05 g (17.5 mmol; 88%) als farbloses Öl. Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten entsprechen den oben angegebenen Daten.

65

Beispiel 39

(3-Boc-3-Aminopropyl)harnstoff $C_9H_{19}N_3O_3$ 217.268 g/mol

1.31 g (7.5 mmol) N-Boc-1,3-Diaminopropan und 0.61 g (7.5 mmol) Kaliumcyanat werden in wäßrigen THF (Verhältnis $H_2O/THF = 0.7 : 1$) gelöst und mit 0.52 ml (9.0 mmol; 1.2 eq) Essigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wird 1.5 h unter Rückfluß erhitzt und anschließend zu einem farblosen, öligen Feststoff eingeengt, der in Essigsäureethylester suspendiert wird. Die organische Phase wird je zweimal mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Nach Flash-Chromatographie mit $CHCl_3/McOH$ -Gemischen (20 : 1 — 15 : 1 — 6 : 1) als Eluenten erhält man ein farbloses Öl.

Ausbeute 1.36 g (6.26 mmol; 84%); $R_f = 0.19$ (D); 0.65 (G).

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 6.76$ [t, 1H, NH-Boc]; 5.89 [t, 1H, NH-Harnstoff]; 5.39 [s, 2H, NH_2 -Harnstoff]; 2.97–2.87 [m, 4H, $CH_2CH_2CH_2$]; 1.49–1.37 [2H, $CH_2CH_2CH_2$, überlagert mit dem tert.-Butyl-Signal]; 1.37 [s, 9H, $OC(CH_3)_3$]

Die Boc-Schutzgruppe wird nach AAV 8 abgespalten.

Ausbeute 0.81 g (99%) als weißer Feststoff ($R_f = 0.17$ Spitze des Streifens der bis zum Startpunkt reicht (G)).

(3-Boc-3-Aminopropyl)harnstoff kann auch nach einer modifizierten Vorschrift von P. Boden et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 1664–1675, dargestellt werden. Die Modifikation zur Originalliteratur besteht in der Verwendung von N-Z-1,3-Diaminopropan anstelle von ungeschütztem Diaminopropan, wodurch man die Reaktanden in nahezu äquimolaren Mengen einsetzen und die Reaktion in konzentrierter Lösung durchführen kann.

Zu einer Lösung von 2.08 g (10.0 mmol) N-Z-1,3-Diaminopropan in 20 ml abs. THF läßt man bei RT unter Argon-Atmosphäre langsam eine Lösung aus 1.46 ml (11.0 mmol; 1.1 eq) Trimethylsilylisocyanat in 10 ml abs. THF tropfen. Man läßt für 2 h bei RT rühren, gibt anschließend 40 ml Wasser zu und läßt weitere 2 h rühren. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man einen weißen Feststoff.

Ausbeute 2.20 g (8.75 mmol; 88%) $R_f = 0.17$ (D).

Die Z-Schutzgruppe wird nach AAV 9 abgespalten und der Aminoalkylharnstoff entsprechend der Literaturvorschrift von P. Boden et al. aufgearbeitet.

Ausbeute 0.92 g (7.85 mmol; 90%) als leicht gelbliches Öl.

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 6.03$ [breites t, 1H, NH-Harnstoff]; 5.42 [bs, 2H, NH_2 -Harnstoff]; 3.95 [bs, 3H, NH_3^+]; 3.04–2.96 [m, 2H, $NH_3^+-CH_2CH_2CH_2-NH$ -Harnstoff]; 2.58 [t, 2H, $NH_3^+-CH_2CH_2CH_2NH$ -Harnstoff]; 1.52–1.41 [m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$]

Beispiel 40

Fmoc-Ncit-OH $C_{21}H_{23}N_3O_5$ 397.431 g/mol

0.5 g (4.27 mmol) (3-Aminopropyl)harnstoff werden mit 0.43 g (4.67 mmol) Glyoxylsäure-Monohydrat nach AAV 3.1 reduktiv aminiert.

Rohausbeute ($C_6H_{13}N_3O_5$ 175.188 g/mol) 0.92 g als weißer Schaum.

1H -NMR Daten von H-Ncit-OH:

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 5.89$ [t, 1H, NH-Harnstoff]; 5.39 [s, 2H, NH_2 -Harnstoff]; 2.97–2.87 [m, 4H, $CH_2CH_2CH_2$]; 1.49–1.37 [m, 2H, $CH_2CH_2CH_2$].

0.92 g nicht gereinigtes H-Ncit-OH werden mit 1.22 g (4.70 mmol; 1.1 eq) Fmoc-Cl nach AAV 4.1 umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie mit Chloroform/Methanol-Gemischen als Eluenten.

Ausbeute 0.97 g (2.44 mmol; 72% nach zwei Stufen) als weißes Pulver.

k': 3.97 (H_2O/ACN 50 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)

1H -NMR (500 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): Hauptkonformation $\delta = 7.89$ [dd, 2H, 7.25 H_2 , Fmoc-Aromat]; 7.64 [dd, 2H, 7.50 H_2 , Fmoc-Aromat]; 7.44–7.29 [m, 4H, Fmoc-Aromat]; 5.86 [bs, 1H, NH]; 5.29 [bs, 2H, NH_2]; 4.48–4.21 [m, 3H, Fmoc-CH und Fmoc- CH_2]; 3.97 [s, 2H, H^a]; 3.25 [t, 2H, H^b]; 2.95 [t, 2H, H^c]; 1.56 [quintett, 2H, H^d]

Nebenkonformation $\delta = 7.89$ [dd, 2H, 7.25 H_2 , Fmoc-Aromat]; 7.64 [dd, 2H, 7.50 H_2 , Fmoc-Aromat]; 7.44–7.29 [m, 4H, Fmoc-Aromat]; 5.94 [bs, 1H, NH]; 5.29 [bs, 2H, NH_2]; 4.48–4.21 [m, 3H, Fmoc-CH und Fmoc- CH_2]; 3.85 [s, 2H, H^a]; 3.08 [t, 2H, H^b]; 2.81 [t, 2H, H^c]; 1.37 [quintett, 2H, H^d].

Bei 340 K ist der Koaleszenzpunkt der cis/trans-Isomeren erreicht und man erhält nur noch einen Signalsatz mit allerdings breiten Signalen für die Methylenprotonen.

^{13}C -NMR (500 MHz, $[D_6]DMSO$, 300K): $\delta = 171.2, 170.9, 158.7, 155.5, 155.4, 143.9, 143.7, 140.8, 140.6, 128.8, 127.6, 127.5, 127.1, 125.1, 124.9, 120.0, 67.0, 66.7, 48.8, 48.3, 46.7, 46.0, 45.7, 36.7, 31.3, 28.9, 28.4$

Synthese eines Ncit Derivats

Beispiel 41

Boc-1,4-Diaminobutan

1,4-Diaminobutan (44.08 g; 0.5 mol) wird in Dioxan (500 mL) gelöst und im Eisbad abgekühlt. Dazu läßt man innerhalb von 4 h Di-tert.-butyldicarbonat in 250 mL Dioxan zutropfen. Die Reaktionslösung wird auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschliessend wird das Lösungsmittel abdestilliert und der gelbe Rückstand in Wasser (100 mL) aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wird dreimal mit Dichlormethan (50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsver-

dampfer zu einem gelben Öl eingengt.
Ausbeute: 9.28 g; 49.3 mmol; 99%.

Beispiel 42

N-(Boc-4-aminobutyl)harnstoff

Zu einer Lösung Boc-1,4-diaminobutan (1.87 g; 9.93 mmol) in THF (25 mL) wird Trimethylisocyanat in 50 mL THF innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur zugetropft. Nach einer Stunde werden langsam 20 mL Wasser zugetropft und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird am Rotationsverdampfer zu einem weissen Pulver eingengt und ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Beispiel 43

Fmoc-Nhcit-OH

N-(Boc-4-aminobutyl)harnstoff (0.96 g; Rohprodukt) wird in 26 mL eines Gemisches aus Trifluoressigsäure, Dichlormethan und Wasser (Verhältnis: 5 : 20 : 1) bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Anschliessend wird das Lösungsmittel abdestilliert und das Rohprodukt an der Lyophylle getrocknet. Dieses gelbe Öl wird mit Glyoxylsäure Monohydrat (0.38 g; 4.15 mmol) in Ethanol (15 mL) gelöst. Mit NaHCO_3 Lösung wird ein pH-Wert von 6.0 eingestellt. Diese Lösung wird bei 5 bar Wasserstoffdruck und Raumtemperatur für 3 Tage mit einer katalytischen Menge 10%igen Palladium/Kohle Katalysator umgesetzt. Der Katalysator wird abfiltriert und die Reaktionslösung eingengt. Das Rohprodukt wird in 10% Na_2CO_3 -Lösung (15 mL) gelöst und mit Dioxan (6 mL) versetzt. Unter Rühren wird bei 0°C Fmoc-Cl (1.18 g; 4.56 mmol) in Dioxan (10 mL) langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird auf Raumtemperatur erwärmt, über Nacht gerührt und anschliessend zu einem grauen Öl eingengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und mit Ether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 1N HCl auf pH 2.0 angesäuert und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit verdünnter HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen des Lösungsmittels wird Fmoc-Nhcit-OH (1.0 g; 59% nach vier Stufen) als weisser Schaum erhalten. Das Rohprodukt wird durch präparative RP-HPLC gereinigt.

Synthese eines Nlys Derivats

Beispiel 44

Fmoc-Nlys(Boc)-OH

Boc-1,4-aminobutan (0.57 g; 3.0 mmol) und Glyoxylsäure Monohydrat (0.28 g; 3.0 mmol) werden in Ethanol/Wasser (1 : 1; 20 mL) gelöst. Mit 1N NaOH wird ein pH-Wert von 6.0 eingestellt. Diese Lösung wird bei 5 bar Wasserstoffdruck und Raumtemperatur für 3 Tage mit einer katalytischen Menge 10%igen Palladium/Kohle Katalysator umgesetzt. Der Katalysator wird abfiltriert und die Reaktionslösung eingengt. Das Rohprodukt wird in 10% Na_2CO_3 -Lösung (15 mL) gelöst und mit Dioxan (5 mL) versetzt. Unter Rühren wird bei 0°C Fmoc-Cl (0.85 g; 3.3 mmol) in Dioxan (10 mL) langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird auf Raumtemperatur erwärmt, über Nacht gerührt und anschliessend zu einem Öl eingengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und mit Ether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 1N HCl auf pH 2.0 angesäuert und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit verdünnter HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen des Lösungsmittels wird Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.63 g; 1.34 mmol; 45% nach zwei Stufen) als weisser Schaum erhalten.

Beispiele 45 bis 47

Synthese von Narg Derivaten

Beispiel 45

Z-Narg(Boc)₂-OMe $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_8$ 522.598 g/mol

0.62 g (1.96 mmol) Z-Norn-OME · HCl werden in 6.5 ml DMSO gelöst. Dazu läßt man langsam eine Lösung aus 0.63 g (2.17 mmol; 1.1 eq) Bis-Boc-S-Methylisothioharnstoff (siehe S. 155) in 0.95 ml (2.17 mmol; 1.1 eq) einer 40%igen methanolischen Triton-B-Lösung tropfen (eventuell muß zum vollständigen Lösen des Guanidierungsreagenzes noch etwas DMSO zugegeben werden). Die Reaktionslösung wird für vier Tage bei RT gerührt und anschließend durch Zugabe einer Lösung aus 10%iger KHSO_4 - und gesättigter NaCl-Lösung (1 : 1, v:v) gequenchet. Das Gemisch wird eingengt und das verbleibende Öl in Essigsäureethylester (5 ml/mmol) aufgenommen, jeweils zweimal mit 5%iger NaHCO_3 -Lösung, verdünnter Salzsäure (pH-Wert = 3) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man 0.91 g (1.74 mmol; 89%) eines gelblichen Öls als Rohprodukt, das durch Flash-Chromatographie mit Essigsäureethylester/n-Hexan-Gemischen (1 : 1.5 → 1 : 1) als Eluent gereinigt wird.

Ausbeute 0.64 g (1.23 mmol; 63%) als farbloses Öl (R_f = 0.50 (B)).

k': 7.42 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm)

k': 3.21 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 μm).

Die Verbindung zeigt cis/trans Isomerie im Verhältnis 1 : 1.1.
¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 8.34 [m, 1H, NH]; 7.34–7.26 [m, 5H, ArH]; 5.09 und 5.05 [s, 2H, Z-CH₂, Urethan]; 4.09 und 4.05 [zwei s, 2H, H^a]; 3.64 und 3.60 [zwei s, 3H, COOCH₃]; 3.31–3.29 [m, 4H, H^b und H^d]; 1.80–1.68 [m, 2H, H^e]; 1.46 und 1.39 [zwei s, 18H, OC(CH₃)₃]

Beispiel 46

Z-Narg(Boc)₂-OH C₂₄H₃₆N₄O₈ 508.572 g/mol

0.64 g (1.23 mmol) Z-Narg(Boc)₂-OMe werden nach AAV 10 verseift.

Ausbeute 0.52 g (1.02 mmol; 84%) als farbloses Öl.

k': 6.33 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

Die Verbindung zeigt cis/trans Isomerie im Verhältnis 1 : 1.2.

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]DMSO, 300K): δ = 8.34 [m, 1H, NH]; 7.35–7.30 [m, 5H, ArH]; 5.08 und 5.05 [zwei s, 2H, Z-CH₂, Urethan]; 4.04 und 4.01 [zwei s, 2H, H^a]; 3.30 [bs, 4H, H^b und H^d, überlagert mit dem Wasser-Signal]; 1.78–1.62 [m, 2H, H^e]; 1.46 und 1.39 [zwei s, 18H, OC(CH₃)₃]

Beispiel 47

Fmoc-Narg(Boc)₂-OH C₃₁H₄₀N₄O₈ 596.680 g/mol

Die Z-Schutzgruppe von 0.52 g (1.02 mmol) Z-Narg(Boc)₂-OH wird nach AAV 9 hydrogenolytisch abgespalten (k': 3.13 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min; Nucleosil 5 µm)) und das Rohprodukt ohne Charakterisierung weiter nach AAV 4.1 umgesetzt.

Ausbeute nach zwei Stufen 0.5 g (0.838 mmol; 82%) als weißer Schaum (R_f = 0.17 (D)).

k': 3.97 (H₂O/ACN 50 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

Die Verbindung zeigt cis/trans-Isomerie.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]DMSO, 300K): Hauptkonformation δ = 8.67 [bs, 1H, NH₁]; 8.51 [bs, 1H, NH-Boc]; 7.88 [d, 2H, Fmoc-ArH]; 7.63 [d, 2H, Fmoc-ArH]; 7.41 [t, 2K, Fmoc-ArH]; 7.36–7.28 [m, 2H, Fmoc-ArH]; 4.40 und 4.25 [zwei d, 2H, Fmoc-CH₂, Urethan]; 4.31–4.18 [m, 1H, Fmoc-CH, Urethan]; 3.95 [s, 2H, H₁]; 3.31 [t, 2H, H^b]; 3.26 [m, 2H, H^d]; 1.72 [m, 2H, H^e]; 1.45 und 1.41 [zwei s, 18H, OC(CH₃)₃]

Nebenkonformation δ = 8.67 [bs, 1H, NH^f]; 8.51 [bs, 1H, NH-Boc]; 7.88 [d, 2H, Fmoc-ArH]; 7.63 [d, 2H, Fmoc-ArH]; 7.41 [t, 2H, Fmoc-ArH]; 7.36–7.28 [m, 2H, Fmoc-ArH]; 4.40 und 4.25 [zwei d, 2H, Fmoc-CH₂, Urethan]; 4.31–4.18 [m, 1H, Fmoc-CH, Urethan]; 3.84 [s, 2H, H^a]; 3.13 [t, 2H, H^b]; 3.05 [m, 2H, H^d]; 1.52 [m, 2H, H^e]; 1.45 und 1.41 [zwei s, 18H, OC(CH₃)₃]

¹³C-NMR (500 MHz, [D₆]DMSO, 300K): Hauptkonformation δ = 127.2, 126.7, 124.6, 119.6, 66.6 (Fmoc-CH₂), 48.6 (C^a), 46.4 (Fmoc-CH), 45.4 (C^b), 26.3 (C^e), 38.5 (C^d), 27.3 (2xBoc)

Nebenkonformation δ = 127.2, 126.7, 124.6, 119.6, 66.6 (Fmoc-CH₂), 48.8 (C^a), 46.4 (Fmoc-CH), 45.0 (C^b), 26.5 (C^e), 38.4 (C^d), 27.3 (2xBoc)

Beispiele 48 bis 58

Synthese von Cetorelix-Derivaten

Die N-terminalen Heptapeptidfragmente von [Nxxx]¹⁻⁶-Cetorelix (Nxxx = Nnal¹, NpCl-phe², Npal³, Nhser⁴ und Ncit⁵) werden durch Festphasensynthese am TCP-Harz nach AAV13 aufgebaut und in Lösung mit dem C-terminalen Tripeptid H-Arg(HCl)-Pro-D-Ala-NH₂ nach AAV 11 (mit HOOBt anstelle von HOBt als Additiv) bei pH = 5.0–5.5 umgesetzt. Das Heptapeptidfragment [Ncit]⁶-Cetorelix wird durch Fragmentkondensation des N-terminalen Tripeptids Ac-D-Nal¹-D-pCl-Phe²-D-Pa³-OH an das am TCP-Harz synthetisierte Tetrapeptid erhalten.

Die chimären Cetorelix-Peptide [Nxxx]^{7,8,10}-Cetorelix (Nxxx = Nleu, Narg und Nala) werden als C-terminale Heptapeptide am S-RAM-Harz aufgebaut und mit dem N-terminalen Tripeptid Ac-D-Nal¹-D-pCl-Phe²-D-Pa³-OH zum Decapeptid verlängert. Diese Peptide liegen nach dem Abspalten vom Harz mit 95%iger TFA (5% Triethylsilan als Scavenger) bereits Seitenketten geschützt vor. Die Aktivierung der N^a-geschützten Aminosäurederivate erfolgt mit den üblichen Kupplungsreagenzien TBTU/HOBt und DIPEA als Base; nur Kupplungen an N-substituierte Glycinderivate werden mit HATU/HOAt und Collidin als Base durchgeführt.

Die Entschützung der Seitenketten erfolgt mit 95%iger TFA (5% Triethylsilan als Scavenger).

Beispiel 48

[(1)Nnal]¹-Cetorelix

[7+3]-Fragmentkondensation

a) Ac-(1)Nnal¹-D-(pCl)Phe²-D-Pa³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-OH · HOAc
 C₆₄H₈₃N₁₀O₁₂Cl · HOAc 1279.928 g/mol

Ausbeute: 169.0 mg (132.0 µmol; 95%; ca. 98% Reinheit)

HPLC: k': 7.31 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

ESI-MS: [M+H]⁺ = 1219.6

b) Ac-(1)Nnal¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

C₇₈H₁₀₈N₁₇O₁₄Cl 1543.275 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 97.4 mg (63.1 µmol; 98%; 92% Reinheit)

HPLC: k': 6.37 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1542.9

c) Ac-(1)Nnal¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ (i.e. [(1)Nnal]¹-Cetrorelix)

C₇₀H₉₂N₁₇O₁₄Cl 1431.060 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 78.2 mg (54.6 µmol; 84% nach zwei Stufen; 98% Reinheit)

HPLC: k': 3.20 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1430.8

Beispiel 49

[N(pCl)phe]²-Cetrorelix

[7+3]-Fragmentkondensation

a) Ac-D-Nal(2)¹-N(pCl)phe²-D-Pal(3)³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-OH · HOAc

C₆₄H₈₃N₁₀O₁₂Cl · HOAc 1279.928 g/mol

Ausbeute: 306.1 mg (239.2 µmol; 85%; ca. 96% Reinheit)

HPLC: k': 7.31 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

ESI-MS: [M+H]⁺ = 1219.5

b) Ac-D-Nal(2)¹-N(pCl)phe²-D-Pal(3)³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

C₇₈H₁₀₈N₁₇O₁₄Cl 1543.275 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 56.3 mg (36.5 µmol; 94%; 94% Reinheit)

HPLC: k': 6.13 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1542.8

c) Ac-D-Nal(2)¹-N(pCl)phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ (i.e. [N(pCl)phe]²-Cetrorelix)

C₇₀H₉₂N₁₇O₁₄Cl 1431.060 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 33.7 mg (23.6 µmol; 46% nach zwei Stufen; 95% Reinheit)

HPLC: k': 3.20 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1430.7

Beispiel 50

[Npal(3)]³-Cetrorelix

[7+3]-Fragmentkondensation

a) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-Npal(3)³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-OH · HOAc

C₆₄H₈₃N₁₀O₁₂Cl · HOAc 1279.928 g/mol

Ausbeute: 0.32 g (0.25 mmol; 89%; 89% Reinheit)

HPLC: k': 6.93 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1219.6

b) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-Npal(3)³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

C₇₈H₁₀₈N₁₇O₁₄Cl 1543.275 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 58.4 mg (37.8 µmol; 97%; 97% Reinheit)

HPLC: k': 5.93 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1542.8

c) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-Npal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ (i.e. [Npal(3)]³-Cetrorelix)

C₇₀H₉₂N₁₇O₁₄Cl 1431.060 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 31.5 mg (22.0 µmol; 34% nach zwei Stufen; 97% Reinheit)

HPLC: k': 2.78 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm) HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1430.7

Beispiel 51

[Nhser]⁴-Cetrorelix

[7+3]-Fragmentkondensation

a) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Nhser(TBDMS)⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-OH · HOAc

C₆₇H₉₁N₁₀O₁₂SiCl 1352.110 g/mol

Ausbeute: 0.31 g (0.240 mmol; 86%; 80% Reinheit)

HPLC: k': 5.72 (H₂O/ACN 50 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1291.6

b) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Nhser⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

$C_{81}H_{116}N_{17}O_{14}SiCl$ 1501.194 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 64.0 mg (42.6 μ mol; 67%; 87% Reinheit; 11% [Nhsr]⁴-entschütztes Cetrorelix)

HPLC: k': 3.50 (H₂O/ACN 50 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μ m)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1500.7

c) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Nhsr⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ (i.e. [Nhsr]⁴-Cetrorelix) 5

$C_{71}H_{94}N_{17}O_{14}Cl$ 1445.087 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 87.0 mg (60.2 μ mol; 79% nach zwei Stufen, 89% Reinheit)

HPLC: k': 2.97 (H₂O/ACN 30 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μ m)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1445.4 10

Beispiel 52

[Ncit]⁶-Cetrorelix

[(3+4)+3]-Fragmentkondensation 15

a) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-Ncit⁶-Leu⁷-OH · HOAc

$C_{64}H_{83}N_{10}O_{12}Cl \cdot HOAc$ 1279.928 g/mol

Ausbeute: 337.6 mg (263.8 μ mol; 94%; 72% Reinheit) 20

HPLC: k': 6.78 (H₂O/ACN 30 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μ m)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1219.5

b) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser(tBu)⁴-Tyr(tBu)⁵-Ncit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂

$C_{78}H_{108}N_{17}O_{14}Cl$ 1543.275 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 43.0 mg (27.9 μ mol, 71%, 92% Reinheit) 25

HPLC: k': 4.82 (H₂O/ACN 30 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μ m)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1542.8

c) Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-Ncit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ (i.e. [Ncit]⁶-Cetrorelix)

$C_{70}H_{92}N_{17}O_{14}Cl$ 1431.060 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 86.1 mg (60.2 μ mol; 57% nach zwei Stufen; 90% Reinheit) 30

HPLC: k': 3.11 (H₂O/ACN 30 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μ m)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1430.7

Beispiel 53

[Nhcit]⁶-Cetrorelix 35

Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal³-Ser⁴-Tyr⁵-Nhcit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ · TFA

$C_{71}H_{94}ClN_{17}O_{14} \cdot C_2HF_3O_2$ 1445,09 + 114,02 = 1559,11 g/mol 40

Das Peptid wird der Fmoc-Strategie folgend am Harz aufgebaut. Die Aktivierung der einzelnen Fmoc-Aminosäuren erfolgt durch die Kupplungsreagenzien TBTU/HOBt. Für die Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)-OH an den N-alkylierten N-Terminus des Peptids H-Nhcit-Leu-Arg-Pro-Sar-Harz wird HATU/HOAt verwendet.

Ausbeute: 97 mg (62,5 μ mol; 44%) 45

HPLC: R_f = 11,3 min (H₂O/ACN 40 (90% in 30 min. Nucleosil 5 μ m)

MS: [M+H]⁺ = 1444,6

Beispiel 54

[Nleu]⁷-Cetrorelix 50

[3+7]-Fragmentkondensation

Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nleu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂ 55

$C_{70}H_{92}N_{17}O_{14}Cl$ 1431.060 g/mol

Ausbeute nach RP-HPLC: 50.6 mg (35.4 μ mol; 11% Gesamtausbeute)

HPLC: k': 2.90 (H₂O/ACN 30 \rightarrow 80% in 30 min. Nucleosil 5 μ m) 60

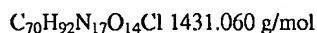
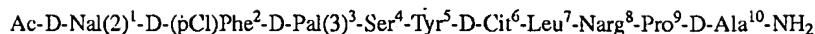
HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1430.6

65

Beispiel 55

[Narg]⁸-Cetrorelix

[3+7]-Fragmentkondensation

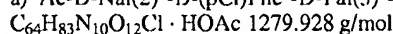
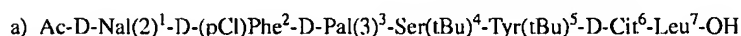


Ausbeute nach RP-HPLC: 94.2 mg (65.8 µmol; >20% Gesamtausbeute; 98% Reinheit)
 HPLC: k': 3.48 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)
 HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1430.7

Beispiel 56

(Nala)¹⁰-Cetrorelix

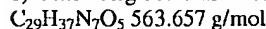
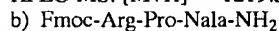
[7+3]-Fragmentkondensation



Ausbeute: 312.1 mg (243.8 µmol; 87%; > 98% Reinheit)

HPLC: k': 7.70 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

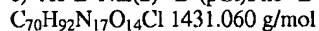
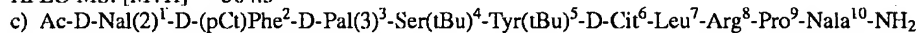
HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1219.5



Testabspaltung vom S-RAM-Harz: 74% Reinheit des Rohpeptids

HPLC: k': 3.28 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

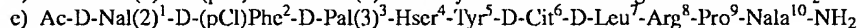
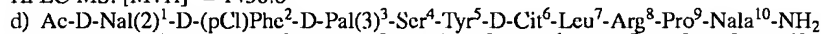
HPLC-MS: [M+H]⁺ = 564.3



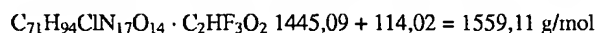
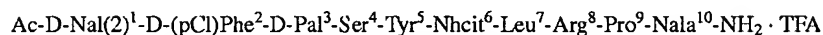
Ausbeute nach RP-HPLC: 90.5 mg (63.2 µmol; 26%, 97% Reinheit)

HPLC: k': 3.01 (H₂O/ACN 30 → 80% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

HPLC-MS: [M+H]⁺ = 1430.8



Beispiel 57

[Nhcit]⁶-[Nala]¹⁰-Cetrorelix

Das Peptid wird der Fmoc-Strategie folgend am Harz aufgebaut. Die Aktivierung der einzelnen Fmoc-Aminosäuren erfolgt durch die Kupplungsreagenzien TBTU/HOBt. Für die Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)-OH an den N-alkylierten N-Terminus des Peptids H-Nhcit-Leu-Arg-Pro-Sar-Harz wird HATU/HOAt verwendet.

Ausbeute: 430 mg (275,8 µmol; 89%)

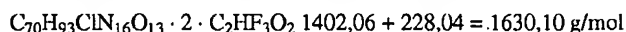
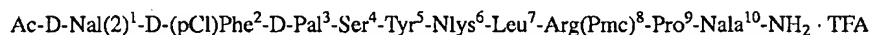
HPLC: R_f = 11,1 min (H₂O/ACN 40 (90% in 30 min. Nucleosil 5 µm)

MS: [M+H]⁺ = 1444,5

Beispiel 58

[Nlys(R)]⁶-[Nala]¹⁰-Cetrorelix

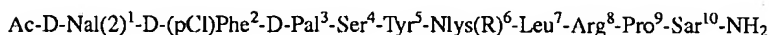
R = ε-N'-4-(4-Amidino-phenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl-



Das C-terminale Heptapeptid H-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Nlys(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Pro-Sar-O-Harz wird am Harz der Fmoc-Strategie folgend aufgebaut. Die Aktivierung der einzelnen Fmoc-Aminosäuren erfolgt durch die Kupplungsreagenzien TBTU/HOBt. Für die Kupplung von Fmoc-Tyr(tBu)-OH an den N-alkylierten N-Terminus des Peptids H-Nlys(Boc)-Leu-Arg-Pro-Sar-Harz wird HATU/HOAt verwendet.

Das N-terminale Tripeptid Ac-D-Nal(2)-D-(pCl)Phe-D-Pal-OH wird mit DIC (Diisopropylcarbodiimid)/HOBt an das

Harz gebundene Heptapeptid gekuppelt. Nach Abspalten des linearen Peptids vom polymeren Träger mit Trifluoressigsäure/Anisol/Wasser (90 : 5 : 5), liegt das Peptid Seitenketten-entschützt als Trifluoressigsäure-Salz vor.



$\text{C}_{81}\text{H}_{104}\text{ClN}_{19}\text{O}_{15}$ 1619,29 g/mol

R = ϵ -N'-4-(4-Amidino-phenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl-

Das Rohpeptid (0.33 g) wird mit 4-(3-Carboxypropionamido)benzamidin Hydrochlorid (60.1 mg; 0.22 mmol) in einer DIC/HOBt-Kupplung umgesetzt und anschliessend durch präparative RP-HPLC gereinigt.

MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1618,7$

Die erfindungsgemäßen Verbindungen nach Formel V wurden auf ihre Rezeptorbindung untersucht. Das Verfahren lehnte sich eng an das in Beckers et al., Eur. J. Biochem. 231, 535–543 (1995), beschriebene Verfahren an. Nach der oben offenbarten Synthese erhaltene Cetorelix-Analoga wurden mit $[\text{I}^{125}]$ (Amersham; spezifische Aktivität 80.5Bq/fmol) unter Verwendung des IodoGen-Reagens (Pierce) iodiert. Das Reaktionsgemisch wurde durch Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gereinigt, wobei mono-iodierte Cetorelix-Analoga ohne unmarkiertes Peptid erhalten wurden. Jeweils etwa 80% des entsprechenden $[\text{I}^{125}]$ -Cetorelix-Analogons war zur spezifischen Rezeptorassoziation geeignet.

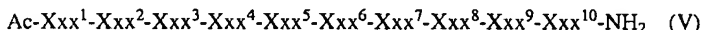
Unter physiologischen Bedingungen wurde mit intakten Zellen ein Rezeptorbindungs-Assay, der in Beckers et al., J. Biol. Chem., 263, 8359–8365 (1988), und Loumaye et al., Endocrinology, 111, 730–736 (1982) beschrieben ist und an dem einige Modifikationen vorgenommen wurden, durchgeführt. Subkonfluente Kulturen von stabilen transfizierten LTK-Zellen wurden durch Inkubation in NaCl/Pi (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na_2HPO_4 , 11.47mM KH_2PO_4)/1mM EDTA abgetrennt und durch Zentrifugieren gesammelt. Das Zellpellet wurde in Bindungspuffer (DMEM ohne H_2CO_3 , mit 4.5 g/l glucose, 10 mM Hepes pH7.5, 0.5% (Masse/Volumen) BSA, 1 g/l Bacitracin, 0.1 g/l SBTI, 0.1% (Masse/Volumen) NaN_3) resuspendiert. Für Verdrängungs-Assays, wurden 0.25×10^6 Zellen/100 μl mit etwa 225pM des $[\text{I}^{125}]$ -Cetorelix-Analogons (spezifische Aktivität $5\text{--}10 \times 10^5$ dpm/pmol) und verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem Peptid als Kompetitor inkubiert. Die Zellsuspension in 100 μl Bindungsmedium wurde in 400 μl Assayröhrchen über 200 μl 84 Vol.-% Siliconöl (Merck Typ 550) / 16 Vol.-% Paraffinöl geschichtet. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C unter langsamem, kontinuierlichem Schütteln wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 2 min bei 9000rpm (Rotortyp HTA13.8; Heraeus Sepatec, Osterode/Germany) von dem Inkubationsmedium getrennt. Die Spitzen der Röhrchen, die das Zellpellet enthielten, wurden abgeschnitten. Zellpellet und Überstand wurden anschließend durch Zählung der γ -Strahlung analysiert. Die Menge an unspezifisch Gebundenem wurde unter Einschluss von unmarkiertem Cetorelix-Analogon bei 1 μM Endkonzentration bestimmt und betrug typischerweise 10% des gesamten Gebundenen. Die Analyse der Bindungsdaten wurde mit dem EBDA/Liganden-Analyseprogramm (Biosoft V3.0) durchgeführt.

Auf diese Weise wurden folgende Bindungsaffinitäten erhalten:

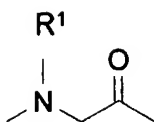
Beispiel 51b)	4,4 nM	
Beispiel 51c)	1,43 nM	40
Beispiel 52c)	0,30 nM	
Beispiel 54	11,42 nM	
Beispiel 55	11,18 nM	
Beispiel 56d)	0,33 nM	
Beispiel 56e)	2,62 nM	45
Beispiel 57	10,12 nM	
Beispiel 58	57,10 nM	

Patentsprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel V

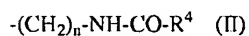


worin einer oder zwei der Bausteine Xxx^1 , Xxx^2 , Xxx^3 , Xxx^4 , Xxx^6 , Xxx^7 , Xxx^8 und Xxx^{10} eine N-iso-Butyl-glycin-(Nleu), N-2-(4'-Hydroxy-phenyl)-ethyl-glycin-(Nhtyr), N-2-Hydroxy-ethyl-glycin-(Nhser), N-(N'-iso-Propyl-4-amino-butyl)-glycin-(Nlys(iPr)), N-3-Guanidino-propyl-glycin-(Narg), N-3-Ureido-propyl-glycin-(Ncit), N-4-Ureido-propyl-glycin-(NHcit), N-Pyrid-2-yl-methyl-glycin-(Npal(2)), N-Pyrid-3-yl-methyl-glycin-(Npal(3)), N-Pyrid-4-yl-methyl-glycin-(Npal(4)), N-Naphth-1-yl-methyl-glycin-(Nnal(1)), N-Naphth-2-yl-methyl-glycin-(Nnal(2)) oder N-(4'-Chlor-phenyl)-methyl-glycin-gruppe (N(pCl)phe) oder eine N-substituierte Glycin-Gruppe mit der allgemeinen Formel I

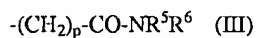


(I)

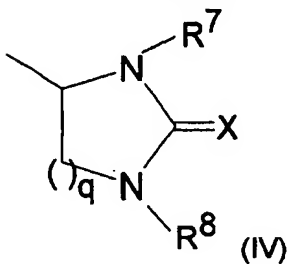
bedeutet, wobei R^1 eine Gruppe mit der allgemeinen Formel II



in der n die Zahl 3 oder 4 darstellt, in der R^4 eine Gruppe mit der allgemeinen Formel III



worin p eine ganze Zahl von 1 bis 4, R^5 Wasserstoff oder eine Alkylgruppe und R^6 eine unsubstituierte oder substituierte Arylgruppe oder Heteroarylgruppe bedeutet, oder R^4 einen Ring der allgemeinen Formel (IV)



(IV)

in dem q die Zahl 1 oder 2, R^7 ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe, R^8 ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe und X ein Sauerstoff- oder Schwefelatom bedeutet, darstellt,

Xxx¹ D-Nal(1), D-Nal(2), Nnal(1) oder Nnal(2),

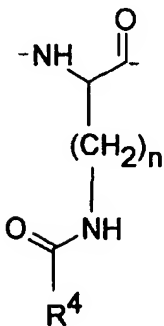
Xxx² D-(pCl)Phe oder N(pCl)phe,

Xxx³ Pal(3), D-Pal(3), Npal(2), Npal(3) oder Npal(4),

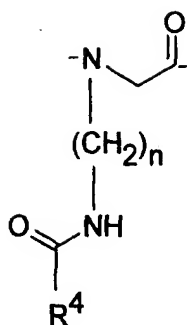
Xxx⁴ Ser, Ser(t.-But.), Hser oder Nhser,

Xxx⁵ Tyr, Tyr(t.-But.) oder Nhtyr,

Xxx⁶ D-Cit, D-Hci, Ncit, Nhcit oder eine D-Aminosäuregruppe der allgemeinen Formel (VI) oder (VII)

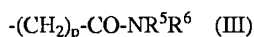


(VI)

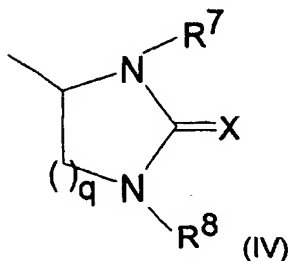


(VII)

in denen n die Zahl 3 oder 4 bedeutet, darstellt, wobei R^4 eine Gruppe mit der allgemeinen Formel III,



worin p eine ganze Zahl von 1 bis 4, R^5 Wasserstoff oder eine Alkylgruppe und R^6 eine unsubstituierte oder substituierte Arylgruppe oder Heteroarylgruppe bedeutet, oder R^4 einen Ring der allgemeinen Formel (IV)



in dem q die Zahl 1 oder 2, R^7 ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe, R^8 ein Wasserstoffatom oder eine Alkylgruppe und X ein Sauerstoff- oder Schwefelatom bedeutet, darstellt,

Xxx^7 Leu, D-Leu oder Nleu,

Xxx^8 Arg, Lys(iPr), Narg oder Nlys(iPr),

Xxx^9 Pro und

Xxx^{10} Ala oder Nala bedeutet,

und deren Salze mit pharmazeutisch akzeptablen Säuren.

2. Verbindung nach Anspruch 1, worin Xxx^6 D-[ε-N'-(Imidazolidin-2-on-4-yl)-formyl]-Lys, N-[ε-N'-(Imidazolidin-2-on-4-yl)-formyl]-Gly, D-[ε-N'-4-(4-Amidinophenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl]-Lys oder N-[ε-N'-4-(4-Amidinophenyl)-amino-1,4-dioxo-butyl]-Gly bedeutet.

3. Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Nhs⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.

4. Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Nhs⁴-Tyr(tBu)⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.

5. Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nleu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.

6. Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Nleu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.

7. Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Narg⁸-Pro⁹-D-Ala¹⁰-NH₂.

8. Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Nala¹⁰-NH₂.

9. Ac-D-Nal(2)¹-D-(pCl)Phe²-D-Pal(3)³-Hser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-D-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Nala¹⁰-NH₂.

10. Verbindung nach Anspruch 1, worin das Salz ein Emmonat ist.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 neben üblichen Träger- und Hilfsstoffen.

12. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel V, dadurch gekennzeichnet, daß man jeweils in an sich bekannter Weise Fragmente aus mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Bausteinen Xxx^m , bei denen m eine ganze Zahl von 1 bis 10 bedeutet und Xxx^1 acetyliert ist, an einer Festphase oder in Lösung nach üblichen Verfahren aufbaut, anschließend die Fragmente an einer Festphase durch Segmentkupplung verbindet und nach Abschluß der Kupplung die Verbindungen der allgemeinen Formel V unter Amidierung am Baustein Xxx^{10} von der Festphase abspaltet.

13. Verwendung der Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur Behandlung hormonabhängiger Tumore, insbesondere Prostatacarcinom oder Brustkrebs, sowie für nicht-maligne Indikationen, deren Behandlung eine LH-RH-Hormonsuppression erfordert.